



**FACULDADE DE FARMÁCIA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

Rosa Lúcia Carneiro da Silva

Desenvolvimento de Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um Parasiticida

Tese do 3º Ciclo de Estudos Conducente ao Grau de Doutoramento em Ciências
Farmacêuticas com Especialidade em Tecnologia Farmacêutica

Trabalho realizado sob a orientação do Professor Doutor José Manuel Correia
Neves Sousa Lobo (Faculdade de Farmácia - Universidade do Porto) e co-
orientação do Professor Doutor Marçal de Queiroz Paulo (Universidade Federal
da Paraíba - Brasil)

Porto

2014

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Agradecimentos

A Deus

Razão da minha existência, que desde o ventre de minha mãe me escolheu e tem cuidado de mim. Agradeço a Deus por minha vida, pela minha família e pelos meus amigos.

Ao Prof. Dr. José Manuel Correia Neves Sousa Lobo

Professor da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

Orientador deste trabalho

Por sua orientação e amizade, por todas as diretrizes durante o desenvolvimento de todo este trabalho. Participar de sua equipe foi um grande privilégio.

Ao Prof. Dr. Rui Manoel Ramos Morgado (*in memoriam*)

Ao idealizador deste trabalho, por seu incentivo, dedicação e esforço. Profundo conhecedor das ciências farmacêuticas, mas, sobretudo um grande e verdadeiro amigo que me ajudou no início desta pesquisa. Conhecê-lo e ter trabalhado com ele foi um grande privilégio. Minha profunda gratidão e admiração.

Ao Prof. Dr. Marçal de Queiroz Paulo

Professor da Universidade Federal da Paraíba – Brasil

Co-orientador deste trabalho

Por sua dedicação, ajuda, companheirismo e ensinamentos sábios que certamente me trarão ricos benefícios para minha carreira profissional e vida pessoal, minha profunda gratidão.

A Prof. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia

Professora da Universidade Federal de Pernambuco – Brasil

Pela ajuda e incansável dedicação, não medindo esforços juntamente com sua equipe, para me ajudar na realização dos experimentos toxicológicos, minha profunda gratidão.

A Prof. Dra. Maria Aparecida Gomes

Professora da Universidade Federal de Minas Gerais – Brasil

Pela contribuição na realização dos experimentos e por sua amizade.

Aos meus pais

Aqueles que estiveram sempre ao meu lado, me incentivando e apoiando, mesmo não entendendo bem o que eu fazia, intercedia a Deus por mim e por esta pesquisa, minha eterna gratidão.

Ao Dr. Josimar Henrique da Silva

Presidente da INFAN S/A

Obrigada por sua confiança e incentivo, meu profundo reconhecimento.

Ao Dr. Avaniel Marinho

Por seu apoio e incentivo. Um amigo que sempre acreditou no meu trabalho, minha profunda gratidão.

Ao José Odaizo da Silva

Colega farmacêutico por sua ajuda e companheirismo.

Ao Cleverson Luíz dos Santos Vigo

Por sua ajuda e contribuição juntamente com sua equipe, na realização dos experimentos.

Ao Pastor Ademir Azevedo da Silva

Por sua amizade e orações em favor desta pesquisa e de minha vida.

Ao Bispo Evandro Sousa

Por sua confiança, amizade e orações em meu favor.

E finalmente, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a construção deste trabalho.

Resumo

Neste trabalho foi obtido o óleo essencial das partes aéreas da planta medicinal *Mentha crispera* L., extraído a partir de cultivo racional sem uso de agrotóxicos, através do processo de hidrodestilação com uso de solvente orgânico. O óleo essencial foi avaliado quanto às propriedades físico-químicas e sua composição, quanto aos constituintes majoritários, através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Foram realizadas análises toxicológicas do óleo essencial através da avaliação da toxicidade aguda e sub-crônica por via oral em ratos Wistar e, determinação da DL₅₀. A partir da realização de testes *in vitro* e *in vivo*, o óleo essencial de *M. crispera* contendo 40-50% de óxido de piperitenona foi avaliado quanto à atividade amebicida e tricomonicida contra *Entamoeba histolytica* e *T. vaginalis* em diferentes concentrações. A partir desses resultados, comprimidos flutuantes de libertação modificada (CFLM) com atividade parasiticida foram produzidos a partir do óleo essencial da *Mentha crispera*, tendo como princípio ativo o constituinte terpênico óxido de piperitenona. Os comprimidos foram fabricados a base dos excipientes HPMC K4M, bicarbonato de sódio e ácido cítrico e foram analisados quanto aos parâmetros farmacotécnicos, físico-químicos e microbiológicos. Para estas análises, foram desenvolvidas e validadas metodologias analíticas para quantificar o marcador / princípio ativo óxido de piperitenona, obedecendo aos critérios da USP-34. Os testes mostraram que os comprimidos flutuantes apresentaram excelentes características de flutualidade, aumentando o tempo de retenção gástrica do princípio ativo da droga vegetal, liberado de forma modificada por mais de 8 horas. Estes resultados foram comprovados através dos estudos realizados *in vitro* (flutualidade *versus* dissolução) e radiográficos, realizados em cães por via oral, monitorados pelo período de 12 horas consecutivas.

Palavras-chave: *Mentha crispera*, comprimidos flutuantes de libertação modificada, *Entamoeba histolytica* e *T. vaginalis*.

Abstract

In this work the essential oil was obtained from the aerial parts of the medicinal plant *Mentha crispa* L., extracted from rational cultivation without the use of pesticides, through the process of steam distillation with organic solvent. The essential oil was evaluated based on the physicochemical properties and composition, by gas chromatography-mass spectrometry (GC / MS) and high performance liquid chromatography (HPLC). Toxicological tests were performed on the essential oil by evaluating acute and sub-chronic oral in rats and determining the LD₅₀. From the tests in vitro and in vivo, the essential oil of *M. crispa* containing 40-50% oxide piperitenone was evaluated for amebicide tricomonicide activity against *Entamoeba histolytica* and *T. vaginalis* in different concentrations. From these results, modified release floating tablets (MRFT) with parasiticide activity were produced from the essential oil of *Mentha crispa*, with the active constituent terpene oxide piperitenone. The excipients that were used in the manufacture of the tablets were HPMC K4M, sodium bicarbonate and citric acid. The tablets were analyzed for pharmacotechnical, physical-chemical and microbiological parameters. To perform theses analysis, we developed and validated analytical methods to quantify the marker / active substance oxide piperitenone meeting the requirements of USP-34. The tests showed that the tablets had very good floating characteristics, increasing gastric retention time of the active substance and releasing it in a modified form for more than 8 hours. These results were confirmed by in vitro studies (floatability versus dissolution) and radiographic studies performed in dogs orally monitored for a period of 12 consecutive hours.

Keywords: *Mentha crispa*, modified release floating tablets, *Entamoeba histolytica* and *T. vaginalis*.

Índice

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract.....	vi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas e Símbolos	xvii
Capítulo I - Objetivos	1
1.1. Objetivos	2
1.2. Objetivos Específicos.....	3
Capítulo II - Introdução	5
2.1. Fitoterapia no Tratamento de Parasitoses	7
2.2. Parasitoses Humana	11
2.2.1. Amebíase	12
2.2.1.1. <i>Entamoeba histolytica</i>	12
2.2.1.2. Sinais e Sintomas.....	13
2.2.1.3. Formas Assintomáticas ou Infecções Assintomáticas da Amebíase	13
2.2.1.4. Formas Sintomáticas.....	13
2.2.1.4.1. Colites Não-Disentéricas.....	13
2.2.1.4.2. Forma Disentérica – Colites amebianas.....	13
2.2.1.4.3. Amebíase Extra Intestinal.....	13
2.2.1.5. Diagnóstico.....	14
2.2.1.5.1. Diagnóstico Clínico.....	14
2.2.1.5.2. Diagnóstico Laboratorial.....	14
2.2.1.5.3. Diagnóstico Imunológico.....	14
2.2.1.6. Tratamento	14
2.3. Óleo Essencial de <i>Menthas</i>	15
2.3.1. Propriedades Físicas e Químicas dos Óleos Essenciais da <i>Mentha</i>	16
2.3.2. Propriedades Físicas e Químicas dos Óleos Essenciais da <i>Mentha crisper</i>	19
2.3.3. Propriedades Farmacológicas do Gênero <i>Mentha</i>	20
2.4. Propriedades Parasitocidas de <i>Menthas</i>	25
2.4.1. Gênero <i>Mentha</i>	25
2.5. Formas Farmacêuticas de Libertação Modificada	30
2.5.1. Principais Vantagens das Formas Farmacêuticas de Libertação Modificada.....	32
2.5.2. Sistemas Farmacêuticos de Libertação Modificada	33
2.5.2.1. Sistemas Matriciais Hidrofílicos.....	33

2.5.2.2. Sistemas Matriciais Hidrofóbicos.....	41
2.5.2.3. Sistemas com Membrana Porosa.....	43
2.5.2.4. Sistema Osmótico.....	43
2.5.2.5. Sistema de Liberação Retardada.....	44
2.6. Sistemas Farmacêuticos Gastrorretentivos	45
2.6.1. Sistemas de Alta Densidade.....	45
2.6.2. Sistemas Flutuantes	45
2.6.3. Sistemas Expansíveis	48
2.6.4. Sistemas Bioadesivos	48
2.6.5. Sistemas Magnéticos	48
2.7. Conclusão	49
Capítulo III - Cultivo, Coleta e Análises do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	51
3.1. Coleta da Planta <i>Mentha crispa</i>	53
3.2. Obtenção do Óleo Essencial da Planta <i>Mentha crispa</i> e Hidrolato	54
3.3. Análises Físico-Químicas do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	54
3.3.1. Aspecto, Odor, Sabor e Cor do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	54
3.3.2. Densidade do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	54
3.3.3. Índice de Refração do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	55
3.3.4. Índice de Acidez do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	55
3.3.5. Determinação dos Constituintes do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	55
3.3.5.1. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM)	55
3.3.5.1.1. Preparo da Curva Analítica.....	55
3.3.5.1.2. Preparo da Amostra.....	56
3.3.5.2. Determinação do Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	56
3.3.5.2.1. Preparo da Amostra do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	56
3.3.5.2.2. Preparo do Padrão.....	56
3.3.5.2.3. Condições Cromatográficas.....	57
3.4. Determinação do Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona no Hidrolato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	57
3.5. Resultados e Discussão	58
3.5.1. Obtenção e Análises Físico-Químicas do Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	58
3.5.2. Desenvolvimento do Método Analítico por CLAE para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	58
3.5.3. Ensaio para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	59

3.5.3.1. Ensaio para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i> por CG/EM.....	60
3.5.3.2. Ensaio para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i> por CLAE	60
3.5.4 Ensaio para Identificar/Quantificar o Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona no Hidrolato.....	62
3.6. Conclusão	63
Capítulo IV - Avaliação da Atividade Amebicida e Tricomonicida do Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i>	65
4.1. Determinação da Atividade Amebicida e Tricomonicida, <i>in vitro</i>	67
4.1.1. Cepas Utilizadas	67
4.1.2. Padronização do Inóculo	68
4.1.2.1. Determinação da Percentagem de Inibição	69
4.1.2.2. Ensaio de Inibição do Crescimento de <i>Entamoeba histolytica</i>	69
4.1.2.3. Ensaio de Inibição do Crescimento de <i>T. vaginalis</i>	70
4.2. Avaliação da Atividade Amebicida <i>in vivo</i> do Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i>	70
4.3. Resultados e Discussão	71
4.3.1. Determinação da Atividade Amebicida e IC ₅₀ , <i>in vitro</i> , Frente a <i>E. histolytica</i>	71
4.3.2. Determinação da Atividade Tricomonicida e IC ₅₀ , <i>in vitro</i> , Frente a <i>T. vaginalis</i>	74
4.3.3. Avaliação da Atividade Amebicida, <i>in vivo</i> , do Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i> ..	78
4.4. Conclusão	78
Capítulo V - Preparação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	79
5.1. Preparação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	81
5.1.1. Materiais.....	81
5.1.2. Equipamentos	81
5.1.3. Preparação dos Comprimidos	81
5.1.4. Verificação dos Comprimidos	82
5.1.5. Produção dos Comprimidos para Estudos Radiográficos	82
5.2. Análises Físico-químicas dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	83
5.2.1. Aspecto dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	83
5.2.2. Dureza dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	83

5.2.3. Friabilidade dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	83
5.2.3.1. Descrição do Método.....	84
5.2.4. Determinação da Uniformidade de Massa das Preparações Apresentadas em Formas Farmacêuticas Unitárias.....	84
5.2.4.1. Descrição do Método.....	84
5.2.5. Diâmetro e Espessura dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	84
5.2.5.1. Descrição do Método.....	84
5.2.6. Umidade do Pó dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida.....	84
5.2.7. Ensaio de Dissolução/Perfil de Liberação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida.....	84
5.2.7.1. Preparo do Padrão	85
5.2.7.2. Condições Cromatográficas	85
5.2.8. Teste de Flutuação <i>in vitro</i> dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	87
5.2.9. Erosão dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	87
5.2.10. Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona nos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida.....	87
5.2.10.1. Preparo da Amostra	87
5.2.10.2. Preparo do Padrão	87
5.3. Análise Microbiológica dos Comprimidos Flutuantes Contendo um Parasitocida.....	88
5.4. Resultados e Discussão	89
5.4.1. Análises do Pó e dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida.....	89
5.4.2. Testes dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	89
5.4.2.1. Dureza dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	90
5.4.2.2. Friabilidade dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	90
5.4.2.3. Determinação da Uniformidade de Massa das Preparações Apresentadas em Formas Farmacêuticas Unitárias.....	91

5.4.2.4. Diâmetro dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	91
5.4.2.5. Espessura dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	92
5.4.2.6. Umidade do Pó dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida.....	92
5.4.2.7. Ensaio de Dissolução/Perfil de liberação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida.....	93
5.4.2.8. Flutualidade <i>in vitro</i> dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	95
5.4.2.9. Erosão dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida	96
5.4.2.10. Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona nos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida.....	97
5.4.2.11. Ensaio Microbiológico.....	98
5.5. Conclusão	99
Capítulo VI - Ensaios Pré-Clínicos.....	101
6.1. Análise de Flutuação dos Comprimidos <i>in vivo</i>	103
6.2. Toxicidade Aguda e Determinação da DL ₅₀	103
6.3. Toxicidade Sub-Crônica	104
6.3.1. Determinação dos Parâmetros Hematológicos.....	104
6.3.2. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos	105
6.4. Resultados e Discussão	105
6.4.1. Testes <i>in vivo</i>	105
6.4.1.1. Estudos Radiográficos.....	105
6.4.1.2. Toxicidade Aguda e Determinação da DL ₅₀	108
6.4.1.3. Avaliação do Peso Corpóreo e dos Órgãos.....	109
6.4.1.4. Avaliação Hematológica e Bioquímica.....	112
6.5. Conclusão	115
Capítulo VII - Conclusão.....	117
7.1. Conclusão	119
Capítulo VIII - Referências Bibliográficas.....	121
8.1. Referências Bibliográficas.....	123
Apêndice I.....	137
Apêndice II.....	189

Lista de Figuras

Figura 1 - Medicamento antiprotozoário produzido a partir de extratos das folhas de <i>Mentha</i> (patenteado).....	10
Figura 2 - Estruturas moleculares de (a) Luteolina e (b) Ácido rosmarínico, constituintes dos extratos hidroalcoólicos de <i>Mentha crispa</i> L., usados como marcadores analíticos do produto fitoterápico GIAMEBIL®.	10
Figura 3 - Prevalência de amebíase em algumas regiões do Brasil (Santos & Soares, 2008).....	12
Figura 4 - Creme dental produzido a partir do óleo essencial da <i>Mentha</i>	16
Figura 5 - Exemplos de substâncias terpenóicas, presentes em espécies de plantas do	17
Figura 6 - Estrutura molecular da substância óxido de piperitenona em 3D.	19
Figura 7 - Cromatograma (CG/EM) do óleo essencial das partes aéreas da <i>Mentha crispa</i>	20
Figura 8 - Prato com carne ornamentado com folhas da <i>Mentha</i>	26
Figura 9 - <i>Mentha crispa</i> L. (família Lamiaceae) florida, cultivada racionalmente.	27
Figura 10 - Concentrações plasmáticas resultantes de múltiplas doses (a) e de uma única dose de forma farmacêutica de liberação modificada (b) (Lyra <i>et al.</i> , 2007).....	31
Figura 11 - Estrutura química do hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).	34
Figura 12 - Medicamento fitoterápico com apresentação de comprimidos de liberação modificada indicado no tratamento de varizes produzido a partir do extrato seco da planta Castanha da Índia.	36
Figura 13 - Temperatura de transição vítrea (T _g) do estado vítreo para o estado maleável (Lopes, 2005).	36
Figura 14 - Fases de uma matriz hidrofílica (Pezzini, 2007).	37
Figura 15 - Alterações observadas nos sistemas matriciais hidrofílicos que intumescem e sofrem erosão (Lopes, 2005).	37
Figura 16 - Relação de espessura da camada de gel versus tempo (Lopes, 2005).	39
Figura 17 - Matriz insolúvel (Pezzini, 2007).	41
Figura 18 - Esquema representativo do interior de uma matriz inerte (Liberal, 2008).	42
Figura 19 - Sistema reservatório: a água penetra na forma farmacêutica e dissolve o fármaco, o qual difunde através da membrana de revestimento presente na superfície da forma farmacêutica (Pezzini, 2007).	43
Figura 20 - Bomba osmótica “push-pull”: a água penetra na forma farmacêutica por osmose, desintegra o núcleo e intumescer o polímero hidrofílico. A expansão da camada osmótica (polímero hidrofílico) promove a liberação do fármaco através do orifício (Pezzini, 2007).	44

Figura 21 - Cultivo da planta <i>Mentha crisper</i> na região Serra dos Cavalos no município de Caruaru, Pernambuco - Brasil.	53
Figura 22 - Coleta matinal (6h) de <i>Mentha crisper</i> na região de Serra dos Cavalos no município de Caruaru, Pernambuco - Brasil.	53
Figura 23 - Etapa do processo de extração industrial do óleo essencial da planta <i>Mentha crisper</i> por hidrodestilação.....	54
Figura 24 - Espectro de varredura da substância óxido de piperitenona no ultravioleta..	59
Figura 25 - Cromatograma do padrão de óxido de piperitenona obtido por CG/EM.	60
Figura 26 - Cromatograma do óleo essencial da <i>Mentha crisper</i> obtido por CG/EM.....	60
Figura 27 - Cromatograma do padrão do óxido de piperitenona obtido por CLAE..	61
Figura 28 - Cromatograma do óleo essencial da <i>Mentha crisper</i> obtido por CLAE.....	61
Figura 29 - Cromatograma do hidrolato obtido por CLAE.....	62
Figura 30 - Cromatograma do padrão do óxido de piperitenona obtido por CLAE.....	62
Figura 31 - Fígado de Hamster infectado com cepa EGG de <i>E. histolytica</i>	71
Figura 32 - Gráfico de dispersão (Inibição x Concentração).....	71
Figura 33 - Gráfico de dispersão (Inibição x Logaritmo [Concentração]).....	72
Figura 34 - Gráfico de dispersão (Inibição x Concentração).	75
Figura 35 - Gráfico de dispersão (Inibição x Logaritmo [Concentração]).....	75
Figura 36 - Comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.....	89
Figura 37 - Dureza dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.....	90
Figura 38 - Friabilidade dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.....	90
Figura 39 - Massa dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.....	91
Figura 40 - Diâmetro dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um parasiticida.....	91
Figura 41 - Espessura dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida.....	92
Figura 42 - Umidade do pó dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.....	92
Figura 43 - Perfil de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida nas quatro formulações (A1, A2, A4 e A5).	94
Figura 44 - Flutualidade <i>in vitro</i> dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.....	95

Figura 45 - Comprimidos de libertação modificada contendo um parasiticida flutuando em meio ácido (HCL 0,1N pH 1,2).....	96
Figura 46 - Erosão dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida.....	96
Figura 47 - Comprimido flutuante de libertação modificada contendo um parasiticida após ensaio de erosão.....	97
Figura 48 - Teor do ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida.	97
Figura 49 - Administração oral da amostra de óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> e animal roedor, pelo método de gavagem.....	103
Figura 50 - Avaliação dos camundongos Swiss, em campo aberto, após administração do óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> em diferentes concentrações.....	104
Figura 51 - Comprimido flutuante de libertação modificada no estômago de cão beagle após 0,5 h da administração.	106
Figura 52 - Comprimido flutuante de libertação modificada no estômago de cão beagle após 1h da administração.	106
Figura 53 - Comprimido flutuante de libertação modificada no estômago de cão beagle após 2h da administração.	107
Figura 54 - Comprimido flutuante de libertação modificada no estômago de cão beagle após 4h da administração.	107
Figura 55 - Comprimido flutuante de libertação modificada no estômago de cão beagle após 8h da administração.	108
Figura 56 - Comprimido flutuante de libertação modificada no estômago de cão beagle após 12h da administração.	108
Figura 57 - Valores médios do peso corpóreo dos ratos Wistar machos submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> (50 µL/kg e 100 µL/kg; v.o.) e grupo controle (óleo de milho (<i>Zea mays</i>) (n=5/grupo)).	111
Figura 58 - Valores médios do peso corpóreo dos ratos Wistar fêmeas submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> (50 µL/kg e 100 µL/kg; v.o.) e grupo controle (óleo de milho (<i>Zea mays</i>) (n=5/grupo)).	111

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Variação sazonal na citotoxicidade dos óleos essenciais extraídos de folhas de quatro espécies de <i>Mentha</i>	24
Tabela 2 - Principais propriedades das HPMC mais frequentemente utilizadas.	35
Tabela 3 - Principais aplicações farmacêuticas da HPMC e polímeros recomendados... 35	
Tabela 4 - Preparação das soluções padrão para construção da curva analítica.	56
Tabela 5 - Condições cromatográficas da análise do ativo/marcador óxido de piperitenona por CG/EM.....	56
Tabela 6 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de teor do ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da <i>Mentha crispa</i>	57
Tabela 7 - Resultados das análises físico-químicas do óleo essencial extraído das partes aéreas da <i>Mentha crispa</i> através de hidrodestilação.	58
Tabela 8 - Resultado da análise quantitativa do óxido de piperitenona no óleo essencial da <i>Mentha crispa</i>	61
Tabela 9 - Modelo de regressão final (Óleo essencial da <i>Mentha crispa</i>).	73
Tabela 10 - Estimativa intervalar do IC ₅₀	74
Tabela 11 - Modelo de regressão final (Óleo essencial da <i>Mentha Crispa</i>).	76
Tabela 12 - Estimativa Intervalar do IC ₅₀	77
Tabela 13 - Fórmulas em percentual dos comprimidos produzidos com HPMC K4M.	82
Tabela 14 - Fórmula em mg dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitocida preparados para os estudos radiográficos.	83
Tabela 15 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de dissolução para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitocida.	86
Tabela 16 - Ordem/modelos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitocida.	86
Tabela 17 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de teor do ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitocida.	88
Tabela 18 - Resultado do teste de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitocida nas quatro formulações (A1, A2, A4 e A5).	93
Tabela 19 - Coeficiente de correlação linear (r) obtido através de linearização do perfil de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitocida.	94
Tabela 20 - Parâmetros de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitocida nas quatro formulações (A1, A2, A4 e A5).	95

Tabela 21 - Resultado do ensaio de contagem de microrganismos viáveis em produtos não estéreis realizado nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.....	98
Tabela 22 - Resultado do ensaio de pesquisa de microrganismos patógenos realizado nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.	98
Tabela 23 - Resultado do ensaio de pesquisa de coliformes fecais e totais realizado nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.	99
Tabela 24 - Percentual de mortos no teste de avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de <i>Mentha crispa</i> em camundongos Swiss (n=10/grupo).....	109
Tabela 25 - Valores médios dos órgãos dos ratos da linhagem Wistar machos (g/100g) submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> L. e grupo controle (Óleo de milho (<i>Zea mays</i>) (n=5/grupo)).	110
Tabela 26 - Valores médios dos órgãos dos ratos da linhagem Wistar fêmeas g/100g) submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> e grupo controle (Óleo de milho (<i>Zea mays</i>) (n=5/grupo)).	110
Tabela 27 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 30 dias, utilizando o óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> nas doses de 50 µL/ kg, 100 µL/ kg e grupo controle (<i>Zea mays</i> (0,3 mL/animal)).....	113
Tabela 28 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 30 dias, utilizando o óleo essencial da <i>Mentha crispa</i> nas doses de 50 µL/ kg, 100 µL/ kg e grupo controle (<i>Zea mays</i> (0,3 mL/animal)).	114

Lista de Abreviaturas e Símbolos

AAS - Ácido Acetil Salicílico
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
A.O.A.C. - Association of Official Analytical Chemists
CAS - Chemical Abstracts Services
CFLM - Comprimido Flutuante de Liberação Modificada
CG - Cromatografia Gasosa
CG/EM - Cromatografia Gasosa/Espectrofotometria de Massa
CG – DIC - Cromatografia Gasosa / Detector de Ionização de Chama
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CHCM - Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CMI - Concentração Mínima Inibitória
DAD - Diode Array Detector
DMSO - Dimetilsulfóxido
ED₄₈₀ - Eficácia de dissolução aos 480 minutos
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EM - Espectrofotometria de Massa
FA - Fosfatase Alcalina
FDA - Food and Drug Administration
GRAS - Generally Recognized as Safe
HCM - Hemoglobina Corpuscular Média
HIV - Human immunodeficiency Virus
HEC - Hidroxietilcelulose
HPMC - Hidroxipropilmetilcelulose
HPLC - High Performance Liquid Chromatography
LDL - Low-Density Lipoprotein
MC - Metilcelulose
MTZ - Metronidazol
OEMC - Óleo Essencial de *Mentha crisper*
OMS - Organização Mundial da Saúde
PA - Para análise
pH - Potencial Hidrogeniônico
QT₄₈₀ - Quantidade de ativo libertada após 480 minutos
RMN ¹H - Ressonância Magnética Nuclear Protônica
T₅₀ - Tempo necessário para libertar 50% do ativo
TGO - Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP - Transaminase Glutâmico-Pirúvica

USP - United States Pharmacopeia
UFMG - Universidade Federal de Minas Gerais
UV - Ultravioleta
V.O. - Via oral
VCM - Volume Corpuscular Médio
VLDL - Very Low-Density Lipoprotein

Capítulo I

Objetivos

1.1. Objetivos

Desenvolver tecnologia para fabricação de comprimidos flutuantes de liberação modificada a partir de princípio ativo natural, obtido a partir da planta *Mentha crispa*, avaliando as propriedades do produto através de análises físico-químicas e microbiológicas dos comprimidos flutuantes, após seis meses de produção para analisar a estabilidade do princípio ativo no medicamento e após, efetuar testes pré-clínicos e de atividade específica para garantir a segurança e eficácia do produto.

1.2. Objetivos Específicos

- I. Cultivar racionalmente sem uso de adubo orgânico a planta *Mentha crispa*;
- II. Realizar coleta das partes aéreas da planta *Mentha crispa*;
- III. Extrair o óleo essencial das partes aéreas da planta *M. crispa* através do processo de hidrodestilação com uso de solvente orgânico;
- IV. Realizar análises físico-químicas do óleo essencial da *M. crispa*;
- V. Realizar análises cromatográficas por CG/EM do óleo essencial da *M. crispa* para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona
- VI. Desenvolver metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *M. crispa*;
- VII. Validar metodologia analítica por CLAE, para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *M. crispa*;
- VIII. Realizar análises cromatográficas por CLAE do hidrolato e do óleo essencial da *M. crispa* para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona;
- IX. Realizar os testes *in vitro* e *in vivo* de avaliação da atividade amebicida e tricomonicida do óleo essencial da *M. crispa*;
- X. Determinar a IC₅₀ do óleo essencial da *M. crispa*;
- XI. Avaliar a toxicidade aguda e determinar a DL₅₀ do óleo essencial da *M. crispa* em animais roedores, por via oral em diversas doses;
- XII. Avaliar a toxicidade sub-crônica do óleo essencial da *M. crispa* em animais roedores por via oral nas doses de 50 e 100 µL/Kg;
- XIII. Avaliar macroscopicamente o aspecto das vísceras dos animais roedores;
- XIV. Realizar análises hematológicas e bioquímicas das amostras de sangue dos animais roedores submetidos à avaliação da toxicidade sub-crônica do óleo essencial da *M. crispa*;
- XV. Avaliar os resultados das análises hematológicas e bioquímicas das amostras de sangue dos animais roedores submetidos à avaliação da toxicidade sub-crônica do óleo essencial da *M. crispa*;

- XVI. Formular os comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida;
- XVII. Desenvolver e validar metodologia analítica por CLAE para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes;
- XVIII. Realizar análises cromatográficas por CLAE dos comprimidos flutuantes para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes;
- XIX. Realizar análises físico-químicas dos comprimidos flutuantes de liberação modificada;
- XX. Realizar análises microbiológicas dos comprimidos flutuantes de liberação modificada;
- XXI. Avaliar a flutualidade *in vitro* dos comprimidos flutuantes de liberação modificada;
- XXII. Realizar testes radiográficos *in vivo* em cães para avaliar a flutualidade dos comprimidos flutuantes de liberação modificada.

Capítulo II

Introdução

2.1. Fitoterapia no Tratamento de Parasitoses

O uso de plantas como remédio é provavelmente tão antigo quanto à própria existência humana. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, merecendo destaque a civilização Egípcia, Grego-romana e Chinesa (www.astral.oxygenio.com).

Na antiguidade o Egito era conhecido como um dos grandes centros de saúde, onde plantas foram catalogadas e empregadas no tratamento de doenças. As plantas também eram utilizadas para fins de beleza e embalsamento. Há cerca de 3000 anos a. C. os egípcios usavam óleos essenciais, como cedro, cravo, canela, noz moscada e mirra para embalsamar os mortos. As técnicas desenvolvidas e utilizadas no Egito para conservação de múmias ainda são um desafio para a química moderna (www.astral.oxygenio.com).

Na China por volta de 3000 a. C. o imperador Cho-Chin-Kei descreveu as propriedades do Ginsen e cânfora (www.portaleducacao.com.br).

Há na bíblia várias referências a plantas curativas ou seus derivados como aloe, mirra e menta (www.portaleducacao.com.br).

Um exemplo marcante de produtos naturais que causaram grande impacto na humanidade, e que de certa forma modificou o comportamento humano moderno, foi à descoberta das substâncias alucinógenas. O ópio, preparado dos bulbos de *Papaver somniferum* é conhecido há séculos por suas propriedades soporíferas e analgésicas. Esta planta era utilizada desde a época dos Sumérios (4000 a. C.) havendo relato na mitologia grega atribuindo a papoula do ópio o simbolismo de Morfeu, o deus do sono (Hostettmann *et al.*, 2003).

Talvez o marco mais importante para o desenvolvimento dos fármacos a partir de produtos naturais de plantas tenha sido o descobrimento dos salicilatos obtidos de *Salix Alba*. Esta fascinante história começa em 1757, quando o reverendo Edward Stone provou o sabor amargo das cascas do salgueiro (*Salix Alba*) e associou-o ao sabor dos extratos de Cinchona. Este fato aguçou sua curiosidade e imaginação, levando-o a comunicarem a real sociedade, seis anos mais tarde, os resultados de suas observações clínicas mostrando as propriedades analgésicas e antipiréticas do extrato daquela planta. Cinquenta anos mais tarde, França e Alemanha rivalizavam-se na busca pelo princípio ativo de *Salix Alba* e em 1828, no Instituto de Farmacologia de Munique, Johann A. Buchner isolou uma pequena quantidade de salicina. Vários outros cientistas empenharam-se em melhorar os rendimentos e a qualidade da salicina contida do extrato natural até que, em 1860, Herman Kolbe e seus alunos sintetizaram o ácido salicílico e seu sal sódico a partir do fenol; em 1874, Friedrich Von Heyden, um de seus alunos estabeleceu a primeira grande fábrica destinada à produção de salicilatos (Junior & Bolzani 2006).

Em 1898, Felix Hofmann pesquisando a cura para a artrite que afligia seu pai, que era sensível aos efeitos colaterais do salicilato de sódio, descobriu o ácido acetil-salicílico, menos ácido que o ácido salicílico. As propriedades terapêuticas do AAS levaram os laboratórios de pesquisa Bayer a elegerem o AAS, como um novo produto a ser lançado no mercado para competir com os salicilatos naturais, o que ocorreu a partir de 1897 sob o nome de aspirina® (Junior & Bolzani 2006).

O descobrimento do AAS marcou de certa forma o final do primeiro período, onde a busca por substâncias naturais terapeuticamente úteis era feita ao acaso. Além disso, o AAS foi o pioneiro dos fármacos sintéticos. Um dos marcos deste novo período foi o surgimento do barbitol, em 1903, indicado como agente hipnótico; em 1904, foi sintetizada a epinefrina, seguida da procaína e da benzocaína, dois anestésicos locais pertencentes à classe dos ésteres do ácido para-aminobenzóicos, sintetizados a partir da estrutura da cocaína (Junior & Bolzani 2006).

Durante a segunda grande guerra, a pesquisa militar foi responsável por grandes avanços na química sintética, motivada pela necessidade de tratamento de infecções, da dor, de processos alérgicos e da depressão. O período de pós-guerra foi de prosperidade para o desenvolvimento dos fármacos sintéticos, como os anti-histamínicos, antipsicóticos, antidepressivos e ansiolíticos. Nesta época, os produtos naturais observaram um período de declínio em termos de investimentos e interesse da indústria farmacêutica (Junior & Bolzani 2006).

Apesar dos avanços tecnológicos observados nos anos que se seguiram, a quantidade de novos fármacos lançados no mercado não tem aumentado proporcionalmente. A química combinatória não conseguiu atingir seu objetivo de ser uma fonte primária de expressiva diversidade química, a qual asseguraria a descoberta de numerosas moléculas ativas capazes de representarem efetivamente novos candidatos a fármacos inovadores. Efetivamente a indústria farmacêutica que pesquisa novos fármacos afirma que o montante gasto em pesquisa e desenvolvimento no setor, em 2004, atingiu valores de 33 bilhões de dólares americanos, representando um crescimento real nos investimentos feitos, ano a ano, não correspondendo, entretanto, a um aumento proporcional nas descobertas inovadoras (Junior & Bolzani 2006).

Neste contexto, os produtos naturais vêm recuperando espaço e importância na indústria farmacêutica seja per-se, seja como fonte inspiradora de novos padrões moleculares bioativos. Na Europa, a fitoterapia já é parte da medicina tradicional, sendo que extratos de plantas e componentes ativos, além de produtos medicinais acabados, estão descritos em várias farmacopeias. Como exemplo marcante podemos citar a erva-de-são-jão (*Hypericum perforatum*) presente na Farmacopeia Portuguesa, 9.3, 2009 (Junior & Bolzani 2006).

No Brasil, o uso de plantas medicinais pela população com a finalidade de tratar enfermidades foi sempre expressivo, principalmente devido à extensa e diversificada flora. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (Pasa *et al.*, 2010).

Entende-se como planta medicinal aquela que, nativa ou cultivada, é utilizada com fins medicinais enquanto que, fitoterápicos são medicamentos obtidos a partir de plantas medicinais, ou seja, são obtidos empregando-se exclusivamente derivados de droga vegetal (extrato, tintura, óleo, cera, exsudato, suco, e outros). Medicamento fitoterápico é caracterizado pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade. Os fitoterápicos, assim como todos os medicamentos, devem oferecer garantia de qualidade, ter efeitos terapêuticos comprovados, composição padronizada e segurança de uso para a população. A eficácia e a segurança devem ser validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas em bibliografia e/ou publicações indexadas e/ou estudos farmacológicos e toxicológicos pré-clínicos e clínicos. A qualidade deve ser alcançada mediante o controle das matérias-primas, do produto acabado, materiais de embalagem, formulação farmacêutica e estudos de estabilidade (ANVISA, 2013).

A fitoterapia é o tratamento de doenças com o uso de medicamentos fitoterápicos e consiste na busca do equilíbrio e da saúde como um todo. Pode ser realizada de forma curativa e também de forma preventiva (OMS, 2003). O uso da planta na forma de extratos, óleos, e outras formas na produção de medicamento são importantes somente quando usadas corretamente. Portanto, a recomendação do uso como verdadeiramente medicinal ou, em outras palavras, como planta medicinal validada e incluída em farmacopeia requer, numa condição ideal, que seu princípio ativo tenha sido identificado ou evidenciado farmacologicamente (Lorenzi & Matos, 2008).

A busca pelo desenvolvimento de um medicamento fitoterápico com atividade antiparasitária com eficácia e, sobretudo baixa toxicidade, levou um laboratório brasileiro a desenvolver o primeiro e único fitoterápico amebicida denominado GIAMEBIL® comprimidos (**Figura 1**).



Figura 1 - Medicamento antiprotozoário produzido a partir de extratos das folhas de *Mentha* (patenteado).

Os princípios ativos desse fitoterápico são obtidos a partir de extratos hidroalcoólicos das partes aéreas da *Mentha crispa* cujo controle de qualidade e doseamento são realizados a partir dos marcadores analíticos heterosídeo de luteolina e o ácido rosmarínico (**Figura 2**), presente no referido extrato. Atualmente o produto GIAMEBIL® é comercializado na forma de comprimido simples com posologia para administração de um comprimido duas vezes ao dia, por três dias consecutivos.

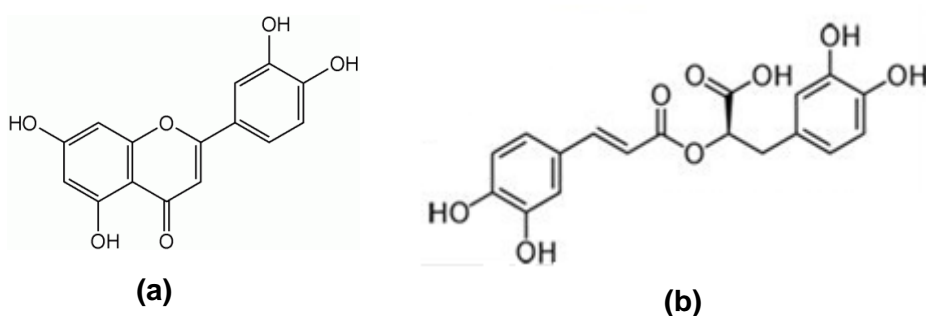


Figura 2 - Estruturas moleculares de (a) Luteolina e (b) Ácido rosmarínico, constituintes dos extratos hidroalcoólicos de *Mentha crispa* L., usados como marcadores analíticos do produto fitoterápico GIAMEBIL®.

Neste contexto, devido os marcadores heterosídeo de luteolina e ácido rosmarínico não serem responsáveis pela atividade parasitíca e a posologia apresentar pouca atratividade dos pacientes, considerando também que Pianowski 2001, realizou um estudo *in vitro*, comprovando a atividade giardicida e determinou a IC₅₀ do óleo essencial da *Mentha crispa*, urge a necessidade de proporcionar maior comodidade ao paciente, razão pela qual o presente trabalho tem como objetivo pesquisar e desenvolver um novo

produto com indicação para tratamento de giárdia e ameba, com nova formulação contendo novos parâmetros tecnológicos farmacotécnicos que propicie segurança e eficácia ao produto na forma de um comprimido flutuante de libertação modificada (CFLM), em dose única, a partir do conhecimento e determinação da dose efetiva através da utilização do óleo essencial da *Mentha crisper* com doseamento do princípio ativo realizado através de controle analítico por CLAE a partir do seu constituinte majoritário o óxido de piperitenona.

2.2. Parasitoses Humana

As parasitoses intestinais helmintíases e protozooses representam a doença mais comum do globo terrestre. São endêmicas e constituem-se num grave problema de saúde pública, sobretudo nos países do terceiro mundo (Monteiro, 1988; WHO, 1987; Monteiro, 1995). Essas infecções se constituem num dos principais fatores debilitantes da população, associando-se frequentemente a quadros de diarreia crônica e desnutrição, comprometendo, como consequência, o desenvolvimento físico e intelectual, particularmente das faixas etárias mais jovens da população (Pedrazini *et al.*, 1988; Vinha & Martins 1981).

Dentre os protozoários destacam-se a *Entamoeba histolytica* e *Giardia lamblia*. A *Entamoeba histolytica* possui distribuição cosmopolita e representa um risco a saúde nos países onde as barreiras sanitárias são inadequadas (Ravdin, 1995). Estima-se que 500 milhões de indivíduos estejam infectados, e que destes 50 milhões apresentem a forma invasiva. Este parasita tem levado a óbito anualmente cerca de 100.000 pessoas, constituindo a segunda causa de mortes por parasitoses, perdendo apenas para malária (Wash, 1988 e Neves, 2010). Destes casos, 96% ocorrem em países em desenvolvimento, especialmente no continente Indiano, África Ocidental, Extremo Oriente e América Central. A prevalência depende da cultura, idade, limpeza, tamanho da comunidade e as condições socioeconômicas (WHO, 1997; Tellez *et al.*, 1997; Ravdin, 1995).

Nos EUA a amebíase endêmica é relativamente rara na população em geral, mesmo assim tem uma prevalência de 2-4% (Goodman & Gilman, 2005).

Os estudos nos últimos 30 anos confirmaram a existência de duas espécies morfológicamente indistinguíveis de *Entamoeba*: *E. histolytica*, espécie patogênica (Stanley Jr, 2001), e *E. dispar*, não patogênica, reclassificadas com base em características bioquímicas, imunológicas e genéticas. Embora patogênica, nem sempre a *E. histolytica* causa sintomas clínicos; estima-se que 10% a 40% dos indivíduos infectados sejam portadores assintomáticos (Oliveira, 2013; Ravdin, 1994) mas com participação fundamental no estabelecimento e manutenção do ciclo patogênico de

amebíase extra intestinal em regiões endêmicas (Tachibana, 2000; Blessmann & Tannich, 2002).

2.2.1. Amebíase

2.2.1.1. *Entamoeba histolytica*

A *Entamoeba histolytica*, protozoário da família Entamoebida e, do filo Sarcomastigophora e classe Sarcodina é o agente etiológico da amebíase.

A amebíase constitui-se num sério problema de saúde pública, apresentando maior prevalência em populações de nível socioeconômico mais baixo e condições precárias de saneamento básico, resultando em altos índices de morbidade. Na cidade de Manaus-Amazonas-Brasil, a infecção atinge 6,8% da população (Benetton *et al.*, 2005); No estado de Pernambuco, na cidade de Belo Horizonte (Minas Gerais) e em Salvador (Bahia) a ocorrência da *E. histolytica* é rara, tendo sido identificada somente a *E. dispar*, organismo não-patogênico morfológicamente semelhante a *E. histolytica* (Santos, 2007) (**Figura 3**).

Os surtos de amebíase no Brasil não apresentam a gravidade e intensidade dos verificados no México, de alguns países da África e da Ásia. Porém, na região Amazônica a amebíase difere das outras regiões do Brasil, porque se manifesta com gravidade. Casos de amebíase disenterica e os abscessos hepáticos são frequentes. Estudos realizados em crianças no Instituto de Medicina Tropical de Manaus no período de 1983 a 1986 revelaram que 11,1% das crianças apresentaram abscessos hepáticos amebianos (Neves, 2010).



Figura 3 - Prevalência de amebíase em algumas regiões do Brasil (Santos & Soares, 2008).

2.2.1.2. Sinais e Sintomas

2.2.1.3. Formas Assintomáticas ou Infecções Assintomáticas da Amebíase

A grande maioria das infecções humanas pela *Entamoeba histolytica*, enquadra-se neste caso, onde 80 à 90% são completamente assintomáticas e a infecção é detectada pelo encontro de cistos no exame de fezes. É a forma mais encontrada no Centro-Oeste do Brasil (Neves, 2010).

2.2.1.4. Formas Sintomáticas

2.2.1.4.1. Colites Não-Disentéricas

É uma das formas clínicas mais frequentes no nosso meio. A colite não-disentérica se manifesta por duas a quatro evacuações, diarreicas ou não, por dia, com fezes moles ou pastosas, às vezes contendo muco ou sangue. Pode apresentar desconforto abdominal ou cólicas, em geral localizadas na porção superior (Neves, 2010).

2.2.1.4.2. Forma Disentérica – Colites Amebianas

Um dos sintomas mais frequentes da amebíase intestinal é a colite amebiana aguda, na qual o indivíduo apresenta dores abdominais intensas e, as fezes contêm muco e sangue, normalmente permanecendo por um ou dois dias. A invasão da mucosa colônica pelos trofozoitos pode levar a hemorragia macroscópica e ser detectada também em crianças sem histórico de diarreia (Adams, 1977b; Jammal, 1985; Merritt, 1982). Ocasionalmente a colite amebiana evolui para perfuração da parede intestinal, podendo apresentar íleo paralítico e deslocamento da mucosa, caracterizando-se um quadro de colite fulminante (Aristizabal *et al.*, 1971; Bank *et al.*, 1971; Cardoso, 1977; Ellyson *et al.*, 1986; Jammal *et al.*, 1985; Takahashi *et al.*, 1997).

2.2.1.4.3. Amebíase Extra Intestinal

Raramente acontece esta forma de amebíase, mas há relatos de vários casos de abscessos hepáticos amebianos na região Amazônica, principalmente nos estados do Pará e Amazonas.

Abscesso amebiano no fígado é a forma mais comum da amebíase extra intestinal. Pode ser encontrado em todos os grupos de idade, com predominância em adultos com 20 a 60 anos de idade, é mais frequente em homens de que em mulheres. As principais manifestações clínicas do abscesso hepático amebiano são dor, febre e hepatomegalia. Os abscessos pulmonares e cerebrais são raros (Neves, 2010).

2.2.1.5. Diagnóstico

2.2.1.5.1. Diagnóstico Clínico

As manifestações clínicas atribuídas à *Entamoeba histolytica* podem ser errôneas devido à grande superposição de sintomas comuns a várias doenças intestinais. Na maioria dos casos, principalmente na fase aguda, poderão ser facilmente confundida com a disenteria bacilar, salmoneloses, síndrome do cólon irritado e esquistossomose. Devido a essas dificuldades de diagnóstico, este só deverá ser considerado definitivo pelo encontro de parasitos nas fezes.

2.2.1.5.2. Diagnóstico Laboratorial

Usualmente é feito com fezes, soros e exsudatos. Embora o exame de fezes seja cansativo, consuma muito tempo na sua execução e dependa da competência do microscopista é, sem dúvida, o mais usado. Tem como objetivo identificar trofozoítos ou cistos (Neves, 2010).

2.2.1.5.3. Diagnóstico Imunológico

Os métodos sorológicos estão sendo cada vez mais empregados, principalmente na amebíase extraintestinal. Os métodos mais utilizados são: ELISA, imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, além da contraímunoeletroforese, imunodifusão em gel de Agar e o radioimunoensaio (Neves, 2010).

2.2.1.6. Tratamento

Os medicamentos utilizados no tratamento da amebíase podem ser divididos em três grupos:

- 1) Amebicidas que atuam diretamente na luz intestinal;
- 2) Amebicidas tissulares;
- 3) Amebicidas que atuam tanto na luz intestinal como nos tecidos

Os amebicidas que atuam diretamente na luz intestinal são os que têm uma ação direta e por contato sobre a *Entamoeba histolytica* aderidas à parede ou na luz do intestino. Os grupos de medicamentos que atuam dessa forma incluem-se os derivados da quinoleína, diiodo-hidroxiquinoleína, iodo-cloro-hidroxiquinoleína e cloridroxiquinoleína; os antibióticos paramomicina e eritromicina, além do Falmonox (teclosan), furoato de diloxamina, clorobetamida e clorofenoxamida.

Os amebicidas de ação tissular são aqueles que atuam na parede do intestino e no fígado. São compostos de cloridrato de emetina, cloridrato de diidroemetina e cloroquina, esta última atua somente no fígado.

Os medicamentos que atuam tanto na luz intestinal como nos tecidos são os derivados imidazólicos, como: metronidazol, ornidazol, nitroimidazol e seus derivados, secnidazol e tinidazol. Os antibióticos são utilizados isolados ou principalmente em combinações com outros amebicidas: tetraciclina e seus derivados, clorotetraciclina e oxitetraciclina; eritromicina; espiromicina e paramomicina (Neves, 2010).

Atualmente, os fármacos sintéticos utilizados no tratamento da amebíase de uma forma geral apresentam efeitos colaterais que devem ser considerados. O furoato de diloxanida é indicado nos casos de infecção amebiana assintomática e os efeitos colaterais mais comuns são flatulência, náuseas, vômitos, diarreia, prurido e urticária (Goodman & Gilman, 2005).

O metronidazol principal droga utilizada no tratamento da amebíase, produz efeitos colaterais diversos como cefaleia, náuseas, boca seca e gosto metálico, podendo ocorrer tontura, vertigem, encefalopatia, convulsões, incoordenação e ataxia (Goodman & Gilman, 2005).

2.3. Óleo Essencial de *Menthas*

Os óleos essenciais, essências vegetais ou óleos voláteis, são produtos naturais formados de misturas de compostos orgânicos que apresentam como principais propriedades a volatilidade, aroma intenso, imiscibilidade em água e solubilidade em solventes orgânicos (Costa, 1975).

O termo óleo essencial é empregado para designar líquidos oleosos voláteis, dotados de aroma forte quase sempre agradável, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo mais frequente, a destilação por arraste de vapor d'água ou hidrodestilação (Craveiro *et al.*, 1981).

Óleos essenciais, em geral, são produtos do metabolismo secundário dos vegetais produzidos em resposta às necessidades imposta pelo meio ambiente. Fatores como tipo de solo, clima, umidade e luz, dentre outros limitam ou maximizam a realização do potencial genético de produção de um composto pela planta. Assim, foi verificado que as plantas que se desenvolvem em solos secos ou áridos com pouco conteúdo de nitrogênio, geralmente produzem maior quantidade de óleos essenciais, enquanto que os vegetais que crescem em *habitat* úmidos, rico em nutrientes e com bom suprimento de nitrogênio, apresentam maior produção de alcaloides e menos teores de óleos essenciais (Amorozo, 1989).

O gênero *Mentha* ocupa posição de destaque na produção de óleos essenciais. As espécies mais utilizadas comercialmente são a *Mentha piperita* e *Mentha arvensis*, tendo o mentol como principal constituinte, produto de grande interesse econômico nas indústrias farmacêuticas, alimentícia e de perfumaria (Castro, 2007). Outro composto de

importância comercial é o linalol, usado na indústria de perfumaria e sabões. A carvona é empregada na aromatização e como flavorizante na indústria alimentícia e farmacêutica, na preparação de formulações bucais e cremes dentais (Garlet *et al.*, 2007).

O óleo essencial da *Mentha* está entre os dez mais comercializados no mundo, o que tem proporcionado o interesse pelo cultivo desta planta (Bruneton, 1991).

O óleo essencial de *Mentha* é amplamente empregado em produtos aromatizantes de uso oral, tais como, cremes dentais, antissépticos bucais, antiácidos, pastilhas refrescantes, gomas de mascar, licores, aditivos para cremes alimentícios e cigarros. A indústria de tabaco é a principal consumidora de mentol em todo o mundo (Garlet *et al.*, 2007; Alonso, 1998).



Figura 4 - Creme dental produzido a partir do óleo essencial da *Mentha*.

2.3.1. Propriedades Físicas e Químicas dos Óleos Essenciais da *Mentha*

Estudos realizados com óleos essenciais extraídos de plantas do gênero *Mentha*, têm revelado a existência de um importante polimorfismo químico (Lawrence, 1978), variedades e quimiotipos.

Os monoterpenos e os sesquiterpenos dos óleos essenciais, formados por duas e três unidades isoprênicas (C_5H_{10}) (**Figura 5**), respectivamente, são encontrados normalmente em sementes, frutos, castanhas, flores e folhas de muitas espécies vegetais. Esses constituintes químicos são considerados em muitos casos, responsáveis pelos odores ou parte principal do *bouquet* das plantas. As substâncias voláteis podem atuar como atraentes de insetos polinizadores; como tóxicas para outras plantas (alelopatia) ou podem servir de defesa contra insetos, através de eficiência olfativa e toxicidade direta (Chavez, 1991).

Os óleos essenciais obtidos por arraste de vapor d'água (hidrodestilação) são constituídos de várias classes de substâncias, principalmente por monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e outras classes de substâncias de baixo peso molecular (Craveiro & De Queiroz, 1993) (**Figura 5**).

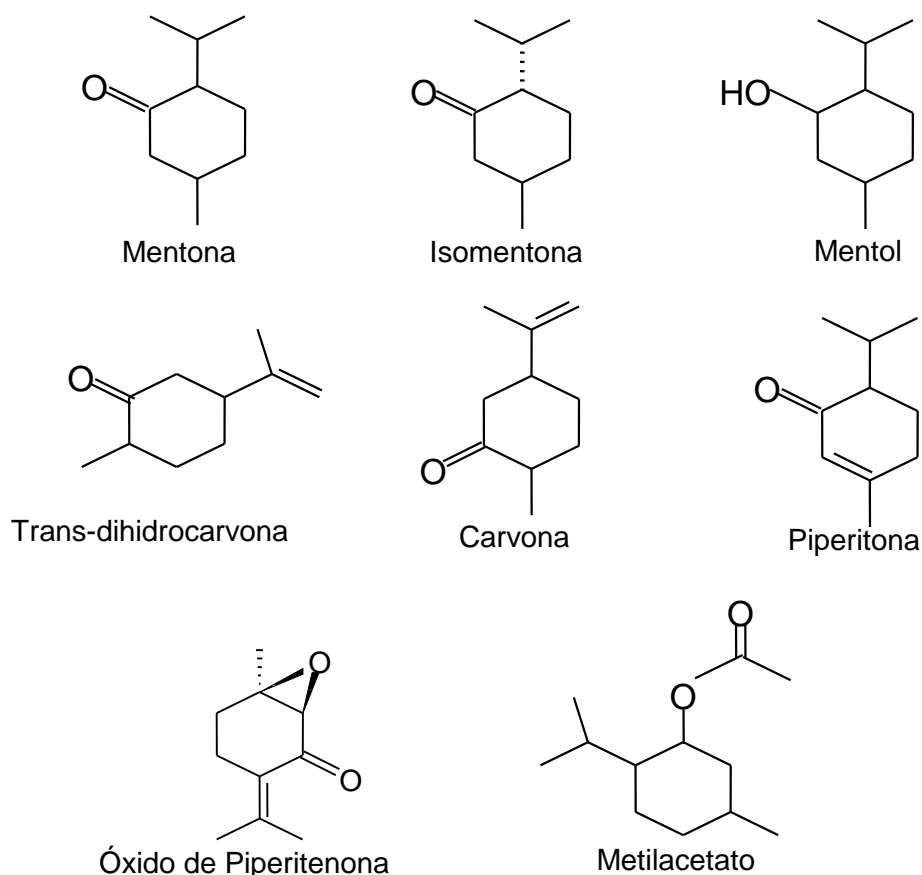


Figura 5 - Exemplos de substâncias terpenoícas, presentes em espécies de plantas do Gênero *Mentha* da família Lamiaceae.

Os principais componentes voláteis dos óleos essenciais das partes aéreas da *Mentha piperita*, *Mentha microphylla*, *Mentha longifolia*, *Mentha pulegium* e da *Mentha rotundifolia*, as duas últimas originadas do Uruguai, mostraram que as composições das seis espécies, identificadas por CG/EM, são bastante diferenciadas entre si quanto aos constituintes e aos percentuais, como apresentada a seguir:

***Mentha piperita* (L.)** - Os óleos essenciais das partes aéreas da *Mentha piperita* apresentaram a seguinte composição: mentol (35%), mentona (28%), isomentona (8%), 1,8 cineol (7,5), mentil acetato, hitrato de *trans*-sabineno (5%), limoneno (3%), β -cariofileno (3,6%), β -mirceno (1,7%), germacreno (2,6%), mentil acetato (3%), piperitona (1%) e em pequena quantidade (< 1,0%) α -pineno, sabineno, β -pineno, 3-octanol, pulejona, aromadendreno, *cis*-p-menten-1-ol (Gherman *et al.*, 2000).

***Mentha microphylla* (L.)** - O óleo essencial obtido por hidrodestilação das partes aéreas frescas de *Mentha microphylla* C. Kock coletada em Gennargentu Mountains (Sardenia, Itália) tem sido investigado por CG e CG/EM. Os resultados apresentaram

como constituintes principais a pulegona (34,1%), óxido de piperitenona (32,9%) e piperitenona (11,3%), limoneno (3,9%), Z-ocimeno (3,9%), linalol (2,7%), β -pineno (1,0%), etil-2-metilbutanoato (1,0%), α -pineno (1,0%) e em menor concentração (<1,0%) (E)2-hexenal, etil-3-metilbutanoato, etil-pentanoato, etil-3-metibutenoato, sabineno, 1-octeno-3-ol, mirceno, etil-hexanoato, (E) ocimeno, terpenolene, etil-ectanoato, nonanal, *trans*-pinocardevol, mentofurano, etil-benzoato, 4-terpineol, mirtenal, verbenona, Z-jasmona e germacreno D (Tomei & Manganeli, 2003).

***Mentha longifolia* (L.) Huds** - O Óleo essencial extraído das partes aéreas de *Mentha longifolia*, cultivada em Marrocos apresentou quantidades relevantes e incomuns de óxido de piperitenona (25%) e óxido de *trans*-piperitona (24%). Essas concentrações diferenciadas das demais espécies de *Mentha* constitui um novo quimiotipo das espécies do gênero (Ghoulami *et al.*, 2001).

***Mentha pulegium* (L.)** - O óleo essencial extraído das partes aéreas de *Mentha pulegium*, cultivada no Norte de Montevideo (Uruguai), foi analisado por CG-DIC e CG/EM apresentou como componentes majoritários a (1R)-(+)-pulegona (73,4%), (1R, 4R)-(+)-isomentona (12,9%), (1R, 4S)-(-)-mentona (3,6%), 3-octanol (1,5%) e isopulegona (1,4%). Em menores concentrações (<1,0%) foram identificados: piperitenona, α -humuleno, limoneno, neo-isomentol, (1R, 3R, 4S)-(-)-mentol, α -pineno, β -pineno, mirceno, neo-mentol, Óxido cariofileno, sabineno, 1,8-cineol, (1R, 3S, 4R)-(+)-isomentol, α -terpineol, piperitona, (E)-cariofileno e canfeno (Lorenzo *et al.*, 2002).

***Mentha rotundifolia* (L.) Huds** - O Óleo essencial obtido por hidrodestilação das folhas de *Mentha rotundifolia*, cultivada no Uruguai foi analisado por CG-DIC e CG/MS. Apresentou como constituintes majoritários: óxido de piperitenona (80,8%), (Z)-hidrato de sabineno (2,0%) e 4-terpineol (1,5%). Em menores concentrações (<1,0%) foram encontrados: α -pineno, sabineno, β -pineno, 1-octeno-3-ol, mirceno, α -terpineno, p-cimeno, limoneno, β -felandreno, 1,8-cineol, (Z)-b-ocimeno, (E)-b-ocimeno, octeno-3-yl acetato, α -terpeneol, β -longipineno, (E)-cariofileno, β -farneseno, germacreno D, (E)-nerolidol e globulol (Lorenzo *et al.*, 2002).

Os constituintes químicos de três hortelãs, *Mentha citrata*, *Mentha gentilis* e *Mentha spicata*, var. *longifolia*, foram estudados a partir das folhas secas destiladas em corrente de vapor ou extraídas com hexano para obter o óleo essencial, que foi analisado através de cromatografia em fase gasosa, utilizando Thermon 1000 como fase estacionária. Em

todos os óleos essenciais, o linalol apresentou-se como o componente mais importante 25,6%; 37,1% e 94,5% nos óleos de *Mentha citrata* 25,6%, *Mentha gentilis* 37,1% e em *Mentha spicata*, var. *longifolia* com 94,5% de rendimento. Entretanto, os óleos de *Mentha citrata* e *Mentha gentilis* apresentaram (-) -linalol, enquanto o (+) -linalol foi obtido do óleo de *Mentha spicata*, var. *longifolia*. O óleo de *Mentha citrata* contém além de linalol, o acetato de linalila (53,24%) e 1,8-cineol (9,39%) como componentes principais. No óleo de *Mentha gentilis*, mentona (27,21%), mentol (9,23%), 1,8-cineol (7,84%) e cariofileno (5,88%) também foram determinados como componentes principais. A variação sazonal influenciou nas concentrações relativas entre o linalol e acetato de linalila nos óleos de *Mentha citrata*. Os resultados mostraram que o conteúdo relativo de acetato de linalila aumenta durante o crescimento, de modo que as folhas maduras contêm mais acetato de linalila que as folhas imaturas das mesmas plantas (Nair & Gunasegaran, 1981; Shimizu, 1988; Hirata *et al.*, 1990; Kokkini *et al.*, 1997).

2.3.2. Propriedades Físicas e Químicas dos Óleos Essenciais da *Mentha crisper*

Os óleos essenciais extraídos das partes aéreas da planta *Mentha crisper* obtido por hidrodestilação com uso de solvente orgânico, apresenta como constituinte majoritário o monoterpeno, óxido de piperitenona (**Figura 6**).

O óxido de piperitenona é um líquido transparente, levemente amarelado. Apresenta fórmula molecular $C_{10}H_{14}O_2$, peso molecular 166.21, é solúvel em água e solvente orgânico e o seu número do CAS é 35178-55-3.

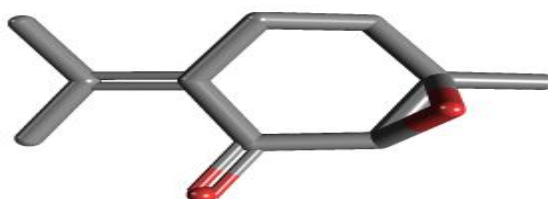


Figura 6 - Estrutura molecular da substância óxido de piperitenona em 3D.

As propriedades físico-químicas do óleo essencial da *Mentha crisper* foram estudadas por Silva, 2004. O óleo apresenta odor característico, sabor picante, cor amarela claro, densidade 0,7027 g/mL, índice de refração 1,610, índice polarimétrico + 114,5 e índice de acidez 0,6258% KOH.

A composição do óleo de *Mentha crisper* foi determinada através de CG/EM. Dentre os principais constituintes do óleo destacam-se o óxido de piperitenona (38,6%), germacreno D (18,2%), trans β -ocimeno e β -cariofileno com teor de 7,4% (**Figura 7**).

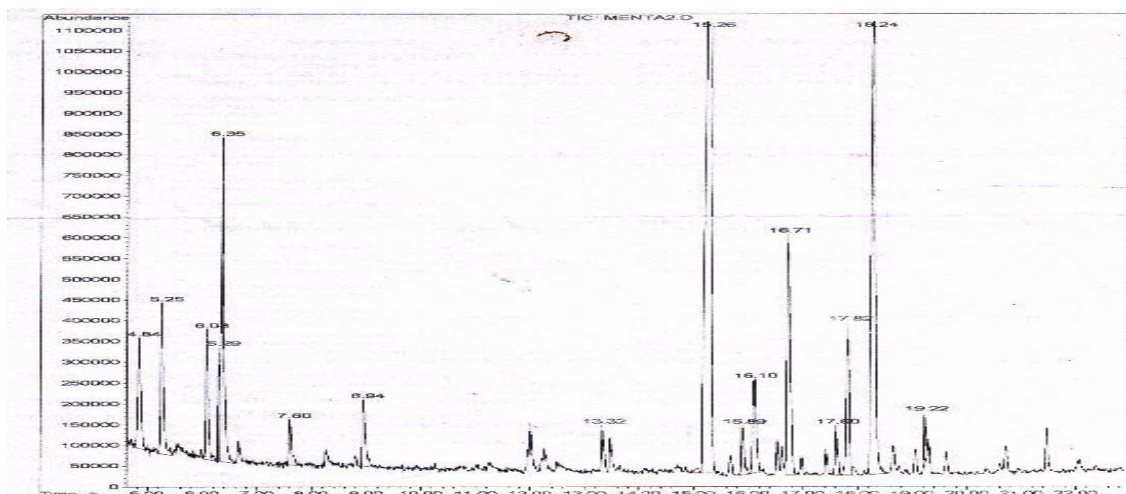


Figura 7 - Cromatograma (CG/EM) do óleo essencial das partes aéreas da *M. crispa*.

Um estudo de sazonalidade e fotoperiodismo foram realizados com a *Mentha crispa* no que se refere ao óleo essencial. Os resultados obtidos por Silva, 2004, demonstraram em relação à sazonalidade, no mês de novembro ocorreu maior rendimento (1,46%) e no mês de fevereiro o menor (<0,01%). Quanto ao constituinte majoritário, o mês que apresentou maior rendimento foi Abril (85,7%) e o menor foi o mês de Novembro (50%). Ao que se refere ao fotoperiodismo, a *Mentha crispa* produziu maior rendimento (1,46%) no horário de 12 horas em comparação às 6 horas (<0,01%) e às 18 horas (0,13%). Quanto ao teor de óxido de piperitenona, as análises mostraram que às 6 horas da manhã, foi o horário em que a planta produziu maior concentração (63,38%) do óxido de piperitenona.

2.3.3. Propriedades Farmacológicas do Gênero *Mentha*

Ao longo dos anos as plantas medicinais de uso popular estão sendo avaliadas através da realização de estudos investigativos, buscando comprovação científica dos seus usos. As plantas do gênero *Mentha* têm sido bastante estudadas com diversos trabalhos publicados em revistas de literatura internacional, demonstrando resultados promissores no que se refere às propriedades farmacológicas.

A partir do extrato bruto da planta *Mentha longifolia*, foi realizado um estudo investigativo para avaliar a atividade antibacteriana e antioxidante desta erva. Para determinar os radicais livres foi utilizado o radical 2,2-difenila-1-picrila-hidrazila. O conteúdo fenólico foi determinado usando o reagente Folin-Ciocalteu. O método para realização do *screening* antibacteriano foi o difusão em Agar. Os resultados demonstraram que os extratos n-butanol e etilacetato, apresentaram uma significativa atividade antioxidante e a presença de altas quantidades de conteúdos fenólicos a partir de plantas secas. O extrato

metanólico apresentou boa atividade antibacteriana contra várias bactérias gram (+) e gram (-) (Khan *et al.*, 2011).

O efeito antinociceptivo do extrato aquoso das folhas da *Mentha piperita*, foi estudado através do uso de testes de dor induzida por ácido acético e placa quente, em camundongos nas doses de 200 e 400 mg/Kg. Nestes testes a *Mentha piperita* apresentou um efeito analgésico significativo, com valores de 51,79% e 20,21 %, respectivamente. Estes resultados indicam que esta planta tem um potencial efeito analgésico que possivelmente pode ter sido mediado central e periféricamente (Taher, 2012).

As avaliações das propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Mentha piperita* contra 21 microrganismos patogênicos ao homem e a plantas foram realizadas *in vitro*. As atividades inibitórias dos microrganismos pelos constituintes químicos: mentol e mentona foram comparados usando a combinação de técnicas de avaliação microbiológica, como microdiluição e a difusão em Agar. Nessa pesquisa o *screening* microbiológico mostrou que os óleos de *Mentha piperita* inibiram fortemente crescimento dos microrganismos patogênicos das plantas e inibiram moderadamente a dos microrganismos patogênicos aos seres humanos (Gokalp *et al.*, 2002).

Os óleos essenciais extraídos de *Mentha suaveolens*, cultivada em várias regiões do Marrocos, foram avaliados em relação à atividade antimicrobiana. Os constituintes aromáticos majoritários dos óleos desta planta foram identificados por RMN ¹H e EM como pulegona, óxido de piperitenona e óxido de piperitona. Essas substâncias ocorrem em quantidades diferentes que dependem da subespécie de *Mentha*. Esses metabólitos como também uma série de outros constituintes aromáticos como carvona, limoneno e mentona foram testados quanto a atividade antimicrobiana, frente a 19 bactérias *gram*-positivas e *gram*-negativas e contra 3 fungos. Os testes foram realizados em meio de cultura fase sólida e ensaios de microtitulação. O óleo essencial rico em pulegona inibiu todos os microrganismos testados, apresentando no resultado final da avaliação uma (CMI) variando entre 0,69 a 2,77 µg/mL. Entre os constituintes do óleo essencial de *M. suaveolens* se destaca o pulegona, o mais efetivo contra os microrganismos testados, seguidos por óxido de piperitenona e óxido de piperitona (Oumgil *et al.*, 2002).

Esses resultados *in vitro* demonstraram que o óleo de *Mentha piperita* afetou os vírus (HSV-1 e HSV-2) antes da adsorção mais não depois da penetração da célula anfitriã. Assim o óleo essencial foi capaz de mostrar o efeito virucida direto em *Herpes simplex*, mesmo considerando a natureza lipofílica do óleo essencial que permite ou facilita a penetração na pele. Esse resultado indica que o óleo de *Mentha* pode ser usado como medicamento tópico indicado como agente virucida em terapêutica de infecções

herpéticas reincidentes após estudo toxicológico e clínico complementar (Schumacher *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais da *Mentha piperita* Iraniana e *Myrtus communus*, extraídos por hidrodestilação, foram analisados por CG/EM, sendo identificados 26 e 32 compostos, respectivamente. Os óleos essenciais da *Mentha piperita* apresentaram boa atividade antimicrobiana contra os microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, superior a atividade dos óleos essenciais da planta *Myrtus communus*. A avaliação da atividade antioxidante pelo radical 2,2-difenila-1-picrila-hidrazila e β -caroteno/ácido linoleico dos óleos essenciais da *Mentha piperita* revelou maior atividade antioxidante do que a *M. communus*. Os resultados obtidos neste teste sugerem uma possível viabilidade de aplicação do óleo essencial da *Mentha piperita* no tratamento de infecções causadas por *Candida albicans* e *Escherichia coli* (Yadegarina *et al.*, 2006).

A partir do extrato bruto de *Mentha arvensis* em diferentes solventes, como metanol, acetato de etilo e clorofórmio, foram realizados testes contra *Staphylococcus mutans* patógeno cariogênico em humanos, *Staphylococcus sanguinis*, *Staphylococcus aureus* e *Lactobacillus casei*, isolados de pacientes infectados por estes microrganismos. Foi aplicado o método de difusão em disco. O extrato metanólico 50% nas concentrações de 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, apresentou um pequeno aumento na zona de inibição (26 à 30 mm e 28 à 32 mm) e o extrato metanólico à 10% nas concentrações de 2,5 mg/mL e 5 mg/mL uma pequena zona de inibição (20 à 24 mm e 22 à 27 mm), quando comparados com os extratos com acetato de etilo e clorofórmio que apresentaram pequena zona de inibição na concentração de 5 mg/mL variando de 15 mm à 18 mm e 13 à 17 mm e na concentração 2,5 mg/mL variando de 14 à 15 mm e 9 à 16 mm. Os resultados da concentração mínima inibitória exibiram valores que demonstram uma promissora atividade da *Mentha arvensis* BHI 0,09 mg/mL. Os metabólitos presentes nas folhas são alcalóides, taninos, flavonóis esteróides, xantonas e glicosídeos. A análise por CG/EM revelou a presença de eucaliptol, isomentona, linalol, mentol, 4-terpineol, ácido oleico, ácido tetradecanóico e ácido palmítico. Estes dados sugerem que os extratos de *Mentha arvensis* podem ser usados com propriedades antimicrobianas e como um potencial a ser explorado na produção de produtos farmacêuticos a base de plantas (Singh *et al.*, 2012).

As plantas medicinais produzem metabólitos secundários que são responsáveis por suas propriedades terapêuticas. A presença destas moléculas é afetada por vários fatores como localização geográfica, fertilidade do solo, parte usada da planta, época e horário de coleta. Foi realizado um estudo que avaliou o impacto da localização geográfica sobre a atividade antimicrobiana da *Mentha spicata*. As amostras da planta foram coletadas de diferentes locais de Khyber Paktoon Khwa (Paquistão) que inclui os distritos de Swat, Mardan, Charsada, Swabi, Peshawar, Kohat, Karak e Bannu. As amostras foram

submetidas à extração hidroalcoólica seguida de fracionamento com n-hexano, clorofórmio, acetato de etilo e n-butanol em ordem crescente de polaridade. O método de difusão em Agar foi usado para avaliar a concentração mínima inibitória das amostras dos extratos, contra seis fungos, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Trichophyton longifusus*, *Microsporum canis*, *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani*. Os resultados indicaram maior concentração mínima inibitória contra os fungos *Aspergillus flavus* e *Fusarium solani* (CMI = 0,25 mg/mL), enquanto que, o fungo *Candida glabrata* apresentou uma moderada atividade (CMI = 0,5 mg/mL). As amostras obtidas das regiões de altitude elevada (Swat e Swabi) e solos férteis (Charsada, Peshawar e Mardan), foram mais efetivos em relação à atividade antifúngica, o que significa um impacto positivo em relação à localização geográfica e riqueza do solo com respeito aos nutrientes (Ullah *et al.*, 2011).

Um estudo para avaliar a atividade antidiarreica da tintura a 20% da *Mentha piperita*, foi realizado em modelo *in vivo*, em ratos. A diarreia foi induzida com óleo de rícino. As dosagens testadas foram 200, 300 e 400 mg/kg. Os teste revelaram que as doses de 300 e 400 mg/kg prolongou o tempo de aparecimento da primeira evacuação e diminuíram a sua frequência (Narranjo *et al.*, 2004).

Várias ervas aromáticas, incluindo espécies da família Lamiaceae, foram avaliadas *in vitro* quanto a atividade anti – HIV-1. A partir destas plantas foram produzidos extratos. Quarenta e seis extratos apresentaram efeito inibitório significativo contra citopatogenicidade induzida HIV-1 em células MT-4. Os extratos de *Melissa officinalis*, *Mentha piperita* e *Mentha piperita* variedade *crispa* apresentaram potente atividade anti-HIV-1 (Yamasaki *et al.*, 1998; Hermann & Kucera 1967).

Os óleos essenciais de espécies de *Mentha*, *M. arvensis*, *M. piperita*, *M. longifolia* e *M. spicata*, foram avaliadas quanto à atividade antimicrobiana sobre vários fungos e bactérias patógenas e atividade citotóxica em células de câncer de mama (MCF-7) e câncer de próstata (LNCaP). Esta pesquisa foi realizada com amostras das plantas coletadas no inverno e no verão. Os resultados revelaram que em relação aos teores de óleos essenciais a *Mentha arvensis*, *M. piperita*, *M. longifolia* e *M. spicata* apresentaram teores maiores no verão (17,00; 12,20; 10,80; e 12,00g kg⁻¹) quando comparados ao inverno (9,20; 10; 50; 7,00 e 9,50g kg⁻¹), respectivamente. Houve uma variação qualitativa e quantitativa dos componentes dos óleos essenciais nas duas estações do ano estudadas. Os componentes majoritários encontrados em ambas as estações foram o mentol, mentona, óxido de piperitenona e carvona, respectivamente. Os óleos essenciais exibiram uma notável atividade antimicrobiana contra a maioria dos microrganismos patógenos testados e boa citotoxicidade (Hussain *et al.*, 2010) **(Tabela 1)**.

Tabela 1 - Variação sazonal na citotoxicidade dos óleos essenciais extraídos de folhas de quatro espécies de *Mentha*.

Espécies	Estação	Atividade Citotóxica IC ₅₀ (µg/mL ⁻¹)	
		MCF - 7	LN –CaP
<i>Mentha arvensis</i>	Verão	55.3 ± 1.9d	50.2 ± 2.7c
	Inverno	59.7 ± 2.2e	55.7 ± 1.5d
<i>Mentha piperita</i>	Verão	75.2 ± 2.9f	90.4 ± 3.7f
	Inverno	80.8 ± 3.2g	95.7 ± 4.5f
<i>Mentha longifolia</i>	Verão	45.2 ± 2.0b	43.5 ± 2.1b
	Inverno	50.6 ± 2.0c	52.0 ± 3.0cd
<i>Mentha spicata</i>	Inverno	80.0 ± 2.4g	75.8 ± 2.3e
	Verão	80.6 ± 2.0g	90.0 ± 3.0
Doxorubicina		28.8 ± 1.2a	33.3 ± 1.1a

^aMédia ± desvio padrão de três diferentes amostras de cada espécie de *Mentha*, analisada em triplicata. Seguida de letras (a – g) na mesma coluna representa diferença significativa (P < 0.05).

A atividade antioxidante dos óleos essenciais e extratos de *Mentha pulegium* iraniana foram avaliados *in vitro* utilizando diferentes métodos. Os resultados revelaram que o óleo essencial não apresentou efeito antioxidante significativo, porém, o extrato aquoso e metanólico exibiram um potente efeito antioxidante (Kambar *et al.*, 2010).

O extrato etanólico da *Mentha haplocalyx* foi avaliado em ratos, quanto ao efeito protetor da asma alérgica. No estudo foi usado o modelo ovalbumina de asma alérgica induzida. O tratamento inibiu significativamente o aumento de imunoglobulina (Ig) E e T – helper 2 (Th2) de tipo citocinas como IL-4 e IL-5 no fluido de lavagem broncoalveolar e tecido pulmonar. A infiltração de células inflamatórias das vias respiratórias em ratos tratados com *Mentha haplocalyx* foi aliviada eficazmente quando comparado com a infiltração no grupo ovalbumina induzida (Lee *et al.*, 2011).

O efeito cardiovascular agudo da rotundifolona (Óxido de piperitenona), o principal constituinte do óleo essencial da *Mentha x villosa*, foi testado em ratos, *in vitro* e *in vivo*. As concentrações de 1, 5, 10, 20 e 30 mg/kg por via intravenosa induziu uma hipotensão significativa e dependente da dose com bradicardia em ratos não anestesiados normotensos. Estes resultados sugerem que a rotundifolona reduz a pressão arterial e frequência cardíaca em animais anestesiados. A ação hipotensiva da rotundifolona pode ser uma consequência de uma diminuição da frequência cardíaca e da resistência

vascular periférica, provavelmente devido a uma estimulação do receptor muscarínico não seletivo (Guedes *et al.*, 2003).

Em um estudo realizado por Lahlou *et al.*, 2002, foi investigado o efeito do tratamento crônico com o acetato de desoxicorticosterona nas respostas cardiovasculares a injeção intravenosa do óleo essencial da *Mentha villosa* em ratos. Estes resultados mostram que o tratamento intravenoso com óleo essencial da *Mentha villosa* diminui a pressão arterial em ratos hipertensos dependendo da dose aplicada. A composição deste óleo foi avaliada por CG/EM tendo apresentado como constituinte majoritário o óxido de piperitenona (95,87%) seguido de piperitenona (2,24%) e 1,8-cineol (1,89%).

2.4. Propriedades Parasiticidas de *Menth*as

2.4.1. Gênero *Mentha*

O gênero *Mentha*, família Lamiaceae inclui plantas aromáticas de difícil classificação taxonômica devido à grande variabilidade em seus caracteres morfológicos e frequente hibridização. Devido aos inúmeros híbridos resultantes do cruzamento espontâneo entre suas espécies, tem gerado confusão em sua taxonomia.

Este gênero reúne aproximadamente 25 a 30 espécies de plantas que podem ser encontradas em diferentes regiões temperadas da Europa, Ásia, Austrália e África do Sul. (Ali *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 2002).

As espécies desse gênero de plantas são caracterizadas pelas propriedades dos seus constituintes e produtos que agregam grande importância econômica com uso dos óleos essenciais (voláteis e aromáticos) usados industrialmente como flavorizantes, aromatizantes e princípios ativos farmacológicos nas indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas (Baser & Kurkcuoglu, 1999).

Os materiais vegetais aéreos de várias espécies de *Mentha* são usados para chás e condimentos em diferentes países. Os infusos das folhas são consumidos pelas suas propriedades espasmolítica, agentes antibacterianos e promotores de secreção gástrica, analgésica e pelas propriedades antienvelhecimento (Sylianco *et al.*, 1986; Tyler, 1993).

A *Mentha* é utilizada na alimentação como condimento na preparação de salgado, doces e licores e em decoração de pratos. O chá é usado há milênios, sendo bastante conhecido principalmente pelo seu sabor característico e sabor refrescante (**Figura 8**).



Figura 8 - Prato com carne ornamentado com folhas da *Mentha*.

A Europa e a Ásia se constituem nos principais centros de dispersão e de uso empírico na medicina popular da maioria das espécies do gênero *Mentha* e, dentre as espécies mais conhecidas e difundidas do gênero no Brasil, destacam-se *Mentha crispa*, *Mentha piperita*, *Mentha arvensis* e *Mentha pulegium* e em muitas ocasiões são confundidas (Craveiro *et al.*, 1981; Dai, 1981; Balbach, 1988; Kokkini *et al.*, 1997; Simões *et al.*, 1999). A *Mentha crispa*, também conhecida popularmente como hortelã-rasteira, hortelã-de-panela, hortelã e menta vilosa. É uma planta herbácea, perene, ereta, com 30-40 cm de altura, híbrida originária do cruzamento da *Mentha spicata* x *Mentha suaveolens* realizado na Europa e atualmente cultivada em vários países, inclusive no Brasil. As folhas são ovais, curtamente pecioladas, opostas, com aroma forte e bem característico. As flores, quando aparecem, ficam dispostas em espigas curtas terminais, miúdas, em inflorescência cimosas (**Figura 9**). Apresenta ações: espasmolítica, antivomitiva, carminativa, estomáquica, antihelmíntica, por via oral, bem como ação antiséptica e antiprurido, por via local (Pianowski, 2001 e Lorenzi & Matos, 2008).



Figura 9 - *Mentha crisper* L. (família Lamiaceae) florida, cultivada racionalmente.

A *Mentha piperita*, conhecida popularmente como hortelã, hortelã pimenta, menta, menta-inglesa, hortelã-apimentada, hortelã-das-cozinhas, menta inglesa e sândalo. Erva aromática, anual ou perene de mais ou menos 30 cm de altura, semiereta, com ramos de cor verde escura a roxa-purpúrea. Folhas elíptico-acuminadas, denteadas, pubescentes e muito aromáticas. É originária da Europa de onde foi trazida no período de colonização do Brasil, sendo muito cultivada como planta medicinal em canteiros de jardins e quintais em todo o Brasil. Seu uso é desde a antiguidade, sendo utilizada como condimento de carnes e massas, bem como para fins medicinais, alimentícios e cosméticos. A literatura etnobotânica registra suas propriedades espasmolíticas, antivomitivas, carminativas, estomáquicas e anti-helmínticas, por via oral e, antibacterianas, antifúngicas e antiprurido de uso tópico. O óleo essencial extraído por hidrodestilação das folhas é rico em mentol, mentona e mentofurano (Lorenzi & Matos, 2008).

A *Mentha arvensis* é conhecida popularmente como hortelã-do-brasil, hortelã-japonesa, vique, hortelã, menta, hortelã-pimenta, hortelã-das-cozinhas e menta inglesa. É uma erva anual ou perene, ereta, com 30 a 60 cm de altura, com folhas ovaloblongas ou oblanceoladas, levemente denteadas, pubescentes e muito aromáticas, medindo 2 a 7 cm de comprimento. Flores esbranquiçadas, reunidas em inflorescência terminais. Originária do Oriente foi trazida ao Brasil pelos imigrantes japoneses que se instalaram no interior de São Paulo, principalmente após o grande terremoto de 1923, ocorrido no Japão. É rica

em mentol, seu óleo essencial são usado para conferir sabor e odor de menta em remédios e balas, também é usada na indústria cosmética para conferir sensação refrescante em loções e cremes de barbear e dental. Seu uso na medicina popular é atribuído as propriedades antiséptica, antivomitiva, descongestionante nasal e antigripal. (Lorenzi & Matos, 2008).

A *Mentha pulegium*, conhecida popularmente como poejo, poejinho, poejo-das-hortas, poejo real, poejo-do-rei, erva-de-são-lourenço, hortelã-miúda, menta-miúda, menta-selvagem e vique. Planta prostrada, perene, graminóide, com cerca de 10 cm de altura, com folhas muito aromáticas, de margem inteira e limbo pontilhado de glândulas translúcidas, de menos de 1 cm de comprimento. Flores de corola violeta, reunidas em fascículos nas axilas das folhas. Originária da Europa, Ásia e Península Arábica é aclimatada em quase todos os países de clima temperado. A planta florida é empregada na forma de infuso, no tratamento caseiro de desordens digestivas, amenorréia, gota, resfriados e para aumentar a micção, segundo a literatura etnofarmacológica. A administração equivalente a 5 g do óleo essencial tem ação abortiva e hepatotóxica, não sendo recomendado o seu uso, por via oral na Europa e nos Estados Unidos, em virtude do seu componente principal, a pulegona, substância responsável pelo seu cheiro e por suas ações tóxicas, acompanhada de mentona e isomentona, bem como de flavonóides (Lorenzi & Matos, 2008).

A atividade larvícida e repelente do óleo essencial extraído das folhas da *Mentha piperita*, foi avaliado contra o *Aedes aegypti*, *Anopheles* e *Culex quinquefasciatus*. Os resultados obtidos demonstraram eficiente atividade larvícida e repelente deste óleo (Kumar *et al.*, 2011; Ansari *et al.*, 2000).

A atividade nematocida de 27 óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas, dentre elas a *Mentha piperita*, *Mentha rotundifolia* e *Mentha spicata*, foi avaliada frente ao nematóide *Meloidogyne javanica*. A análise cromatográfica dos óleos essenciais destas plantas apontou como constituintes majoritários isômeros de 1,2 – epoximentila (74%) e piperitona (13%) na *Mentha rotundifolia* e (-) carvona (13%) e limoneno (19%) na *Mentha spicata*. A *Mentha piperita* demonstrou atividade nematocida e dentre todos os vinte e sete óleos essenciais testados, os óleos da *Mentha rotundifolia* e *Mentha spicata* apresentaram maior atividade nematocida nos testes *in vitro*. Acredita-se que os constituintes majoritários destas plantas sejam responsáveis pela atividade nematocida (Oka *et al.*, 2000).

Foi realizado um estudo com a *Mentha crispa*, para avaliar a eficácia terapêutica no tratamento da giardíase. O estudo consistiu inicialmente de uma triagem de indivíduos com giardíase. Em seguida foi realizado um estudo randomizado aberto, em paralelo com o controle ativo. Amostras coprológicas foram coletadas de 1622 pacientes entre maio de

2005 e maio de 2007 para uma série de exames parasitológicos. Sessenta e dois pacientes com *Giardia lamblia* foram selecionados e distribuídos em dois grupos. O primeiro grupo com 50 pacientes foi tratado com 2 g de secnidazol e o outro com 46 pacientes 2 g de *Mentha crispera*. Após sete dias foram realizadas análises por enzima imunoensaio em amostras de fezes recém-coletadas. O resultado obtido mostrou que o grupo que recebeu o secnidazol apresentou um maior percentual de cura (84,0 %) quando comparado com a *Mentha crispera* (47,83 %) (Teles *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Mentha pulegium* foram testados contra *Echinococcus granulosus* e comparado à eficácia deles de acordo com a exposição e concentração. Ambos apresentaram atividade protoscolicida, porém a *Mentha pulegium* demonstrou um efeito mais forte do que a *Mentha piperita*. O efeito protoscolicida foi observado após 12 dias de incubação e atingiu 0% após 18 dias. O óleo essencial de *Mentha piperita* produziu apenas um efeito tempo-dependente. Aos 24 dias, a viabilidade dos cistos decresceu aproximadamente 50%. Estudos por microscopia eletrônica de varredura revelaram que a camada germinativa de cistos perdeu a característica da estrutura multicelular. O óleo essencial da *Mentha pulegium* apresentou como constituinte majoritário o óxido de piperitenona, sugere-se que este componente seja responsável pelo efeito anti-helmíntico detectado (Maggiore *et al.*, 2012).

O experimento realizado por Érica, 2008, avaliou o efeito *in vitro* do hidrolato de *Mentha villosa*, em cinco diferentes concentrações (20%, 40%, 60%, 80% e 100%), no desenvolvimento de ovos de nematóides gastrintestinais de bezerras, por meio da técnica de coprocultura quantitativa. Somente o hidrolato a 20% apresentou pouco efetivo. Os hidrolatos a 40%, 60% e 80% apresentaram percentagem de eficácia de 91,88%, 94,15% e 98,40%, respectivamente. Enquanto que o hidrolato a 100% mostrou-se equivalente ao controle positivo, realizado com a utilização do anti-helmíntico albendazol, que apresentou efetividade de 100%. Porém, o resultado dos testes *in vivo* não provocou redução na contagem de ovos de nematóides nos bovinos amostrados. A análise por CG/EM do hidrolato da *Mentha villosa* mostrou a presença do constituinte majoritário, óxido de piperitenona, na concentração de 93,62%.

A atividade anti-helmíntica da *Mentha villosa* foi estudada através do uso do decocto desta planta em ensaio *in vitro* nas concentrações de decoctos (0,31 a 10 mg/mL) em *Haemonchus contortus*. O resultado obtido neste trabalho investigativo indicou que o decocto da *Mentha villosa* apresentou atividade inibitória contra este parasita. Na concentração de 2,5 mg/mL o decocto de *Mentha villosa* apresentou eficácia de 96,8 a 97,76% não sendo estatisticamente diferente do anti-helmíntico tiabendazol, usado como controle positivo (Macedo *et al.*, 2012).

Um estudo realizado por Dua *et al.*, 2011, avaliou a atividade antiprotozoária de 17 plantas medicinais de uso tradicional de Garhwal região no noroeste do Himalaia, Índia. O ensaio *in vitro* mostrou que o extrato clorofórmico da *Mentha piperita* apresentou atividade contra *Trypanosoma brucei rhodesiense*. Entretanto, os extratos clorofórmicos, metanólicos e com éter petróleo não apresentaram atividade contra *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium falciparum* e *Leishmania donovani*.

Os óleos essenciais da *Mentha piperita*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus* foram avaliados contra Tricostrongilídeos de ovinos infectados (95% *Haemonchus contortus* e 5% *Trichostrongylus* spp). A análise por cromatografia gasosa demonstrou que o constituinte majoritário da *Mentha piperita* foi o mentol (42,5%), enquanto que do *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon schoenanthus* foi geraniol (81,4% e 62,5%, respectivamente). Nos testes *in vitro* o óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus* apresentou melhor atividade contra o helminto Tricostrongilídeos de ovinos seguido do *Cymbopogon martinii*, enquanto que a *Mentha piperita* apresentou menor atividade (Katiki *et al.*, 2011).

Os extratos etanólicos e aquosos de nove espécies de plantas de uso popular na Turquia, dentre elas a *Mentha longifolia*, foram testados como antihelmínticos. Em ambos os extratos estudados exibiram significativa atividade antihelmíntica (Kozan *et al.*, 2006). Estudos realizados *in vitro* e *in vivo*, avaliaram a atividade esquisomicida do óleo essencial da *Mentha crispera*. Este estudo revelou resultados promissores nas concentrações testadas contra vermes jovens e adultos de *Schistosoma mansoni* no sistema porta-hepático (Silva & Albuquerque, 2011; Feitosa & Albuquerque, 2011).

2.5. Formas Farmacêuticas de Libertação Modificada

Os medicamentos ao longo dos anos têm alcançado avanços tecnológicos, farmacotécnicos que resultaram em benefícios para a qualidade de vida do homem. Neste sentido, foram desenvolvidas várias formas farmacêuticas de cremes, géis, soluções, xaropes, cápsulas e comprimidos, entre outras formas, proporcionando facilidades de uso e garantia da segurança e eficácia.

Os medicamentos na forma de comprimidos são as apresentações farmacêuticas mais usadas em virtude de oferecer vantagens ao paciente, como: praticidade de uso, segurança de dosagem, tamanho de dose reduzida, facilidade de ser administrado e de ser transportado.

De acordo com a Farmacopeia Portuguesa 9.0 Edição 2009, os comprimidos são preparações sólidas contendo uma dose de uma ou de várias substâncias ativas. São obtidos aglomerando por compressão um volume constante de partículas ou por outro processo de fabricação apropriado como a extrusão, a moldagem ou a liofilização. Os

comprimidos são destinados à via oral. Alguns são deglutidos ou mastigados, outros são dissolvidos ou desagregados em água antes da administração e outros devem permanecer na boca para aí libertarem a substância ativa. As partículas são constituídas por uma ou várias substâncias ativas, adicionadas ou não de excipientes como diluentes, aglutinantes, desagregantes, deslizantes, lubrificantes, compostos que podem modificar o comportamento da preparação do tubo digestivo, corantes autorizados pela Autoridade competente e aromatizantes.

Muitas substâncias ativas, veiculadas em comprimidos de liberação imediata, têm uma ação terapêutica de curta duração, implicando em adoção de posologia repetida de dose pelo paciente, a intervalos relativamente longos. Isto ocorre devido às elevadas oscilações das concentrações plasmáticas do princípio ativo, podendo ocasionar períodos com concentrações subterapêuticas e em outros casos, o fármaco ultrapassar o limiar de toxicidade, conforme apresentado na **figura 10**.

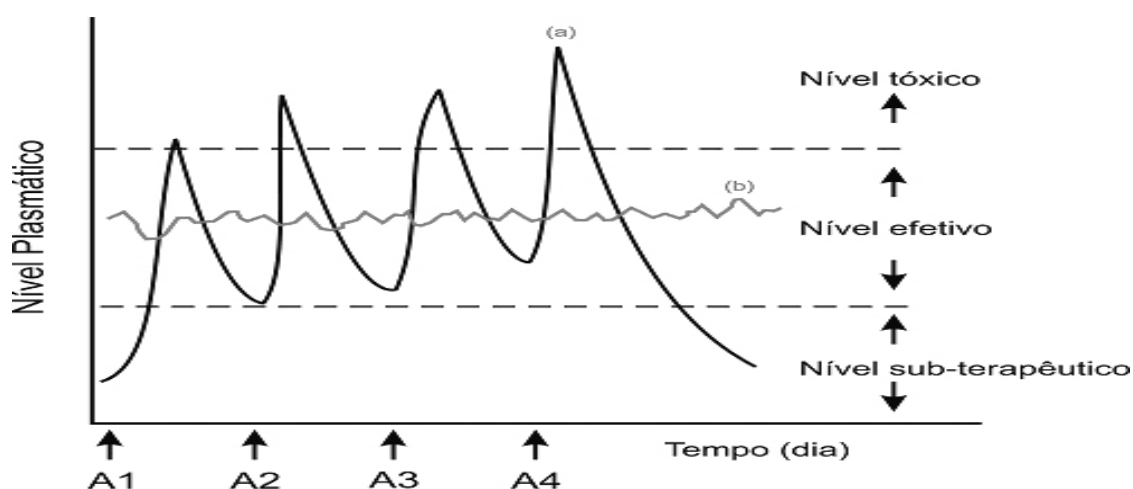


Figura 10 - Concentrações plasmáticas resultantes de múltiplas doses (a) e de uma única dose de forma farmacêutica de liberação modificada (b) (Lyra *et al.*, 2007).

Com o objetivo de obter um sistema farmacêutico de comprimidos de administração oral, que proporcione uma modulação de liberação da droga, o formulador poderá fazer uso de um sistema conhecido por forma farmacêutica de liberação modificada, através da qual é possível manter as concentrações plasmáticas da droga dentro dos limites terapêuticos, durante o espaço de tempo pretendido (Coelho, 2007).

De uma forma geral, as formas farmacêuticas de liberação modificada, conforme as características de liberação do fármaco pelo sistema farmacêutico podem ser classificadas em formas farmacêuticas de:

- Liberação prolongada,
- Liberação retardada e,
- Liberação sequencial.

Segundo a Farmacopeia Portuguesa 9.0 2009, forma farmacêutica de liberação modificada é: a preparação em que a liberação da, (ou das) substância(s) ativa(s) foi objeto, quanto a velocidade e/ou ao local onde ocorre, de uma modificação deliberada resultante de um processo específico e/ou de um método de fabrico especial, sendo, portanto diferente da que se verifica com uma forma convencional administrada pela mesma via.

As formas farmacêuticas de liberação prolongada são um tipo especial de forma farmacêutica de liberação modificada, em que a velocidade de liberação da (ou das) substância(s) ativa(s) é inferior à que se verifica com uma forma farmacêutica de liberação convencional administrada pela mesma via. A liberação prolongada resulta de um processo específico de formulação e/ou de um método de fabrico especial.

As formas farmacêuticas de liberação retardada são um tipo de forma farmacêutica de liberação modificada que se caracteriza por uma liberação retardada da (ou das) substância(s) ativa(s). A liberação retardada resulta de um processo específico de formulação e/ou de um método de fabrico especial. As formas farmacêuticas de liberação retardada incluem as preparações gastrorresistentes, tal como são definidas nas monografias gerais de formas farmacêuticas sólidas administradas por via oral da Farmacopeia Portuguesa.

As formas farmacêuticas de liberação sequencial são um tipo especial de forma farmacêutica de liberação modificada que se caracteriza por uma liberação sequencial da (ou das) substância(s). A liberação sequencial resulta de um processo específico de formulação e/ou de um método de fabrico especial (Farmacopeia Portuguesa, 2005).

2.5.1. Principais Vantagens das Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada

Facilidade de adesão do paciente ao tratamento, devido à simplificação do sistema posológico, em virtude da diminuição do número de administrações diárias, resultando em maior conforto e comodidade do paciente.

Diminuição das oscilações do nível sanguíneo durante o tratamento e consequentemente diminuição dos efeitos secundários ou quedas acentuadas da concentração plasmática, proporcionando maior eficácia ao tratamento.

Economia em virtude de uma única dose substituir várias doses simples.

Diminuição do risco de esquecimento de tomada da dose.

Diminuição dos efeitos secundários.

2.5.2. Sistemas Farmacêuticos de Liberação Modificada

Nas últimas décadas, a tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um incremento na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada. Existe uma variedade de sistemas que podem ser empregados para promover a liberação modificada de um fármaco, entre esses sistemas estão incluídos os lipossomas, as bombas osmóticas, os revestimentos entéricos, os sistemas transdérmicos, os pró-fármacos, os sistemas matriciais poliméricos, entre, outros.

2.5.2.1. Sistemas Matriciais Hidrofílicos

As matrizes são dispersões ou soluções de um fármaco em uma ou mais substâncias capazes de modular a sua liberação, quando utiliza polímeros hidrofílicos são chamadas de matrizes hidrofílicas.

As matrizes hidrofílicas são os sistemas mais populares para a modulação de liberação de drogas em comprimidos.

Os sistemas matriciais hidrofílicos compreende os polímeros de origem natural e semi-sintéticos nele estão incluídos os derivados celulósicos como a metilcelulose (MC), a hidroxietilcelulose (HEC), a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), entre outras e os polímeros não celulósicos naturais como o agar-agar, os alginatos, o quitosano, entre outros. Os polímeros sintéticos podemos citar os carbômeros e polioxis (Liberal, 2008).

2.5.2.1.1. Hidroxipropilmetilcelulose (HPMC)

Um dos derivados da celulose mais usados (desde o início dos anos 60) em comprimidos como retardante da liberação de fármacos, em formulações orais, é a hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

O éter propilenoglicólico da metilcelulose HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) tem a estrutura molecular principal de celulose, carboidrato natural que contém estruturas repetidas de unidades de anidroglicose. Na Europa, o HPMC é conhecido também pelo nome de Hipromelose, cuja estrutura molecular está representada na **figura 11** (Coelho, 2007).

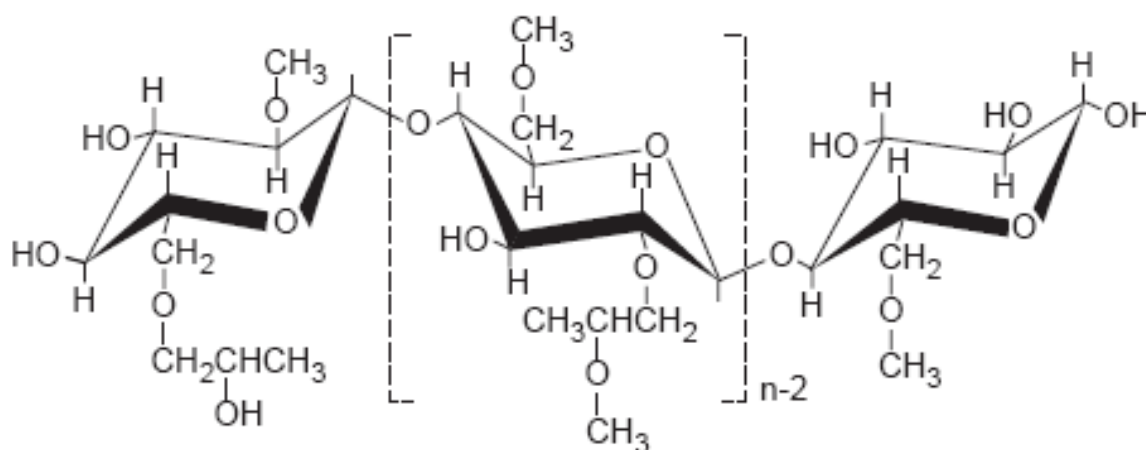


Figura 11 - Estrutura química do hidroxipropilmetilcelulose (HPMC).

A popularidade do HPMC deve-se as suas características não tóxicas, não iônicas, capacidade de incorporar elevadas quantidades de substâncias ativas, rapidez e a economia da tecnologia associada à sua preparação e à possibilidade de fabricação de comprimidos matriciais por compressão direta, sem necessidade de prévia granulação, facilitando o processo de fabricação e proporcionando uma diminuição no tempo de preparação dos comprimidos (Lopes, 2005).

A aplicação industrial do HPMC é bem fundamentada e se encontra consagrada como o polímero hidrofílico mais utilizado no desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de drogas. O HPMC é um promissor material para ser aplicado em filmes para alimentos, e é também utilizado na indústria de alimentos como agente gelificante e estabilizante (Siepmann & Peppas, 2001).

As especificações do HPMC estão presentes na Farmacopeia Portuguesa 9.3 2009, USP, Farmacopeia Japonesa e Farmacopeia Europeia.

A **tabela 2** apresenta as principais propriedades dos tipos de HPMC, mais utilizados na modulação de liberação de fármacos e na **tabela 3** se encontram listadas as principais aplicações farmacêuticas da HPMC.

Tabela 2 - Principais propriedades das HPMC mais frequentemente utilizadas.

Tipo Polímero (Premium)	Metoxi (%)	Hidroxipropil (%)	Viscosidade (mPa.s) – Solução a 2%	pH (Solução a 1%)
K 100 LV	19-24	7-12	80-120	5,5-8,0
K 4 M	19-24	7-12	3000-5600	5,5-8,0
K 15 M	19-24	7-12	11250-21000	5,5-8,0
K 100 M	19-24	7-12	80000-120000	5,5-8,0
E 4 M	28-30	7-12	3000-5600	5,5-8,0
E 10 M CR	28-30	7-12	7500-14000	5,5-8,0

Tabela 3 - Principais aplicações farmacêuticas da HPMC e polímeros recomendados.

Aplicação	Tipo de Polímero	Quantidade Recomendada
Liberção Modificada	K 100LV Premium CR K 4M Premium CR K 15M Premium CR K 100M Premium CR E 4M Premium CR E 10 Premium CR	20 – 55%
Revestimento de Comprimidos	E3, E5, E6, E15LV Premium	0,5% - 5%
Granulação	E5LV, E15LV, A15LV, K3 Premium	2 – 6%
Preparações Líquidas	A4M, K4M, K100M, F4M, Premium	1 – 30%
Mucoadesão	K 100M	5 – 70
Películas	Todos	-
Cápsulas	E3, E5, E6, E15, E50, F4 Premium LV	-

Atualmente, existe no mercado um medicamento fitoterápico na forma farmacêutica comprimidos de libertação modificada, utilizando a planta Castanha da Índia, fabricado a partir de hipromelose (**Figura 12**).



Figura 12 - Medicamento fitoterápico com apresentação de comprimidos de liberação modificada indicado no tratamento de varizes produzido a partir do extrato seco da planta Castanha da índia.

2.5.2.1.2. Mecanismos de Libertação dos Fármacos a Partir de Matrizes Hidrofílicas

Nesses sistemas a liberação da droga é regulada pelos processos de intumescimento, difusão e erosão (Bettini *et al.*, 2001).

Em geral, a liberação dos fármacos incorporados em sistemas constituídos por polímeros hidrofílicos baseia-se na transição do estado vítreo (estado configuracional altamente emaranhado) para o estado maleável, resultado da penetração da água na matriz (Lopes, 2005) (**Figura 13**).

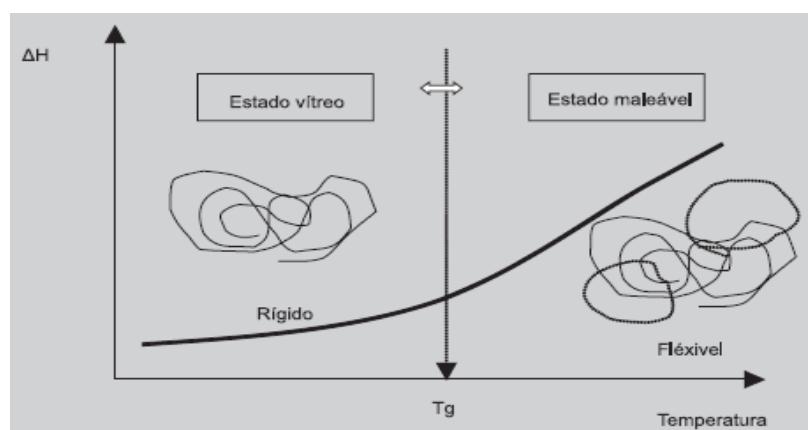


Figura 13 - Temperatura de transição vítrea (T_g) do estado vítreo para o estado maleável (Lopes, 2005).

Quando a forma farmacêutica entra em contato com os fluidos gastrintestinais, o polímero na sua superfície é hidratado e intumescce, formando uma camada gelificada. Essa camada é posteriormente dissolvida, promovendo a erosão do comprimido. O fármaco é liberado por difusão através dessas camadas gelificadas e/ou erosão da matriz, como ilustrado na **figura 14** (Pezzini, 2007).

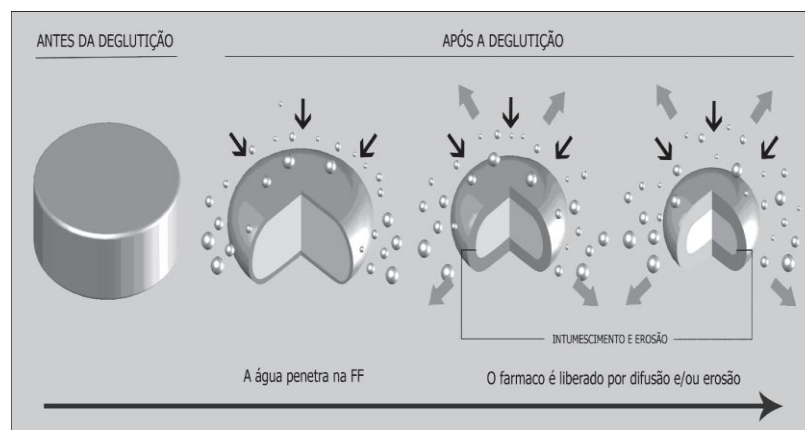


Figura 14 - Fases de uma matriz hidrofílica (Pezzini, 2007).

A etapa de liberação dos fármacos a partir de sistemas farmacêuticos de matriz hidrofílica envolve as várias fases representadas na **figura 15**.

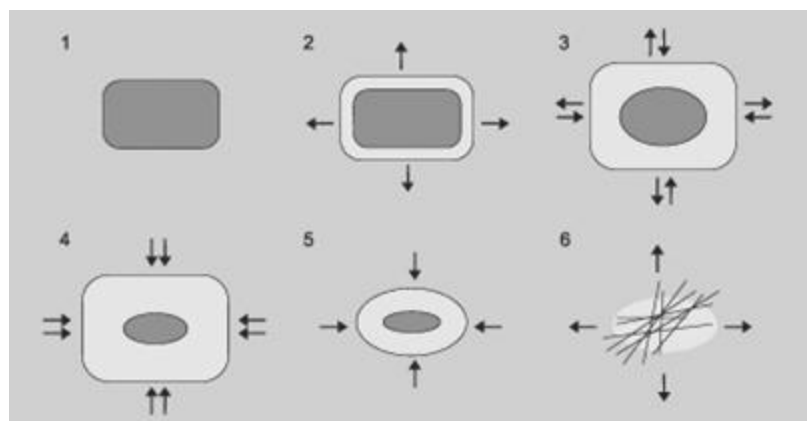


Figura 15 - Alterações observadas nos sistemas matriciais hidrofílicos que intumescem e sofrem erosão (Lopes, 2005).

A primeira fase (1) caracteriza-se pela hidratação da matriz hidrofílica através do contato com o meio de dissolução ou com o fluido aquoso gastrointestinal.

Após a hidratação do sistema com consequente liberação imediata do fármaco existente à superfície do comprimido, ocorre o intumescimento das cadeias poliméricas, com formação da camada gelatinosa de polímero (estado maleável) a volta do núcleo seco do comprimido (2).

A penetração da água continua, mas nesse momento através da camada gelificada, que vai se hidratando e a camada exterior gelificada sofre erosão. Estes dois fenômenos ocorrem ao mesmo tempo e o sistema matricial mantém um volume mais ou menos constante (3 e 4).

Quando a penetração da água na matriz gelificada excede um valor crítico de concentração (concentração na qual as interações entre a água e o polímero aumentam com consequente redução das interações polímero - polímero), as cadeias poliméricas começam a se separar, alargando os espaços onde a difusão do fármaco ocorre. Nesta fase, a taxa de hidratação diminui relativamente à taxa de erosão (5). As cadeias poliméricas dispersam-se na camada mais externa, resultando em aumento da taxa de erosão.

Em consequência do aumento da distância entre as cadeias poliméricas, estas deixam de estar interligadas entre si, separando-se com subsequente desintegração total do sistema (6) (Lopes, 2005).

O primeiro passo do processo de intumescimento do polímero e de dissolução da substância ativa começa com a penetração da água no sistema matricial. A água diminui a temperatura de transição vítrea do polímero, que no caso do hidroxipropilmetilcelulose, diminui de 184°C para 37°C, com isso ocorre uma transição de estado do material polimérico do estado vítreo para o estado maleável, formando uma camada gelificada.

Este processo provoca um aumento da mobilidade das cadeias poliméricas, favorecendo o transporte da substância ativa já dissolvida.

Durante a liberação do fármaco, a camada de gelatina é exposta a mudanças contínuas da sua estrutura e espessura.

O crescimento da camada gelificada do polímero ocorre em três fases (**Figura 16**):

Na primeira fase (a) observa-se um aumento rápido da espessura da camada de gel, em virtude da penetração da taxa de absorção de água ser superior a desintegração das cadeias de polímero, provocando o intumescimento.

Na segunda fase (b), a espessura do gel se mantém constante, a velocidade de desintegração é equivalente à velocidade de intumescimento.

A fase final (c) ocorre quando todo o polímero está hidratado na forma gelatinosa, a espessura da camada gelificada diminui até desaparecer completamente a matriz gelificada, ocorrendo à desintegração das cadeias poliméricas.

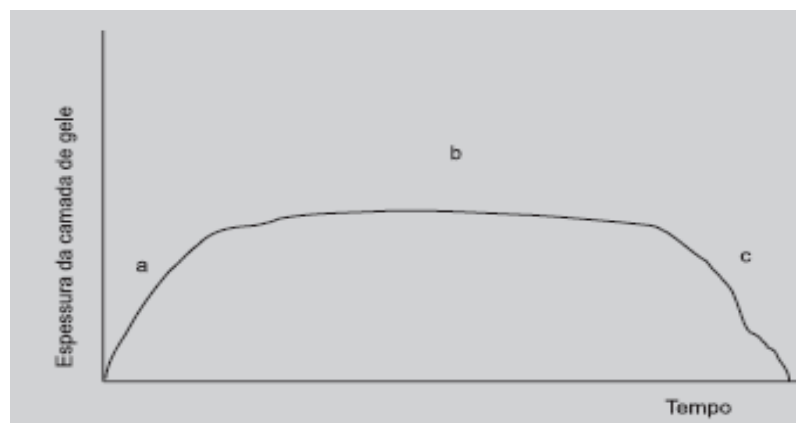


Figura 16 - Relação de espessura da camada de gel versus tempo (Lopes, 2005).

2.5.2.1.3. Cinética de Libertação de Fármacos a Partir Sistemas Hidrofílicos

A cinética de liberação de fármacos a partir de sistemas matriciais deste tipo está diretamente relacionada com a variação de espessura da camada gelificada.

Assim sendo, varia de um processo inicial do tipo Fickiano para um processo anômalo (não-fickiano), acabando por fim com as características de um processo de primeira ordem.

No entanto, nem sempre se observam estas três fases durante o período de liberação do fármaco a partir do sistema matricial, em particular devido às baixas taxas de desintegração de alguns polímeros como, por exemplo, a hidroxipropilmetilcelulose. Resumindo, pode-se dizer que a formação da camada gelificada é um fator primordial neste tipo de mecanismos de controle da liberação de fármacos.

Os fenômenos que governam a formação da camada gelificada são a penetração da água, o intumescimento do polímero, a dissolução e a difusão da substância ativa, e erosão da matriz polimérica. Uma vez que o controle da liberação da substância ativa é obtido pelo controle da difusão e a difusão da substância ativa é obtida pelo controle da difusão das moléculas através da camada gelificada e essa camada é susceptível de se dissolver ou sofrer erosão é forçoso controlar esses processos para poder controlar a liberação da substância ativa.

Resumindo, podemos afirmar que os mecanismos de liberação de um fármaco a partir de uma matriz intumescível são a difusão do fármaco através da camada gelificada e o transporte de fármaco devido ao relaxamento do polímero. A velocidade de difusão da substância ativa depende da dissolução da substância ativa e da erosão da matriz, uma vez que estes dois processos afetam diretamente o gradiente de concentração do fármaco na camada gelificada (Coelho, 2007).

Este processo de liberação não segue o mecanismo de difusão descrito por Fick, no entanto pode ser descrito por uma equação semi-empírica.

$$Q = kt^n$$

Onde Q representa a fração de fármaco libertada em determinado período de tempo t. A velocidade específica k, incorpora as características da rede macromolecular e do fármaco, enquanto n é o expoente difusional. De acordo com várias investigações (Baneja, 1986) demonstraram que o valor de n é indicativo do tipo de mecanismo de liberação que ocorre no sistema. Para $n=0,5$, o fármaco segue um mecanismo de difusão Fickiano, que é conduzido por diferenças químicas de gradiente. Para $n=1$, o fármaco é libertado de acordo com um transporte de relaxamento que é associado com tensões e com transições de fase nos polímeros hidratados. Para valores de n entre 0,5 e 1, uma difusão não fickiana é frequentemente observada como resultado da contribuição conjunta da difusão do fármaco e da erosão do polímero. Na tentativa de descrever este tipo de transporte, Nicholas Peppas, introduziu um segundo termo na equação anterior:

$$Q = k_1 t^n + k_2 t^{2n}$$

Onde k_1 e k_2 são constantes que refletem as contribuições relativas do mecanismo Fickiano e dos mecanismos de relaxamento. Esta equação tem sido aplicada com sucesso na descrição da liberação de fármacos a partir de matrizes poliméricas hidrofílicas (Coelho, 2007).

2.5.2.1.4. Vantagens dos Sistemas Matriciais Hidrofílicos

As matérias-primas são, em geral, baratas e usualmente classificadas como GRAS (generally regarded as safe);

Podem incorporar grandes quantidades de fármaco;

São erodíveis, reduzindo, a possibilidade de matrizes “fantasmas”;

É fácil obter por compressão direta, granulação por via úmida ou compactação por rolos, utilizando-se equipamentos comumente disponíveis;

Sua tecnologia de obtenção é bem-establishada;

Requer o uso de equipamento farmacêutico de fabricação de fácil aquisição, comum ao uso de fabricação de comprimidos simples;

Permite obter diferentes tipos de perfis de liberação: ordem zero, primeira ordem, bimodal, etc.

2.5.2.1.5. Desvantagens dos Sistemas Matriciais Hidrofílicos

A liberação do fármaco é dependente de dois processos de difusão, a penetração da água pela matriz hidratada no interior do núcleo não-hidratado e a difusão do fármaco dissolvido pela matriz hidratada.

Se a camada externa da matriz hidratada sofre erosão, o perfil de liberação pode ser complicado.

2.5.2.2. Sistemas Matriciais Hidrofóbicos

As matrizes hidrofóbicas podem ser divididas em dois subgrupos: as matrizes lipídicas e as matrizes inertes. Em ambos os casos o fármaco é liberado essencialmente por difusão, conforme ilustrado na **figura 17**. No caso das matrizes lipídicas pode ocorrer o mecanismo de erosão associado (Pezzini, 2007 e Liberal, 2008).

2.5.2.2.1. Matrizes Lipídicas

As matrizes de ceras apresentam um conceito simples. São de fácil preparo, utilizando-se compressão direta, compactação por rolos ou granulação por fusão. O controle e velocidade da liberação do fármaco é relativamente grosseiro (Aulton, 2008).

Os fármacos são dispersos na matriz lipídica usando fundamentalmente duas técnicas:

Na primeira adiciona-se uma solução ou dispersão do fármaco e dos aditivos à matéria gorda fundida, sendo posteriormente eliminado o solvente por evaporação. A segunda consiste na incorporação direta do fármaco e dos aditivos à matéria gorda fundida previamente (Coelho, 2007).

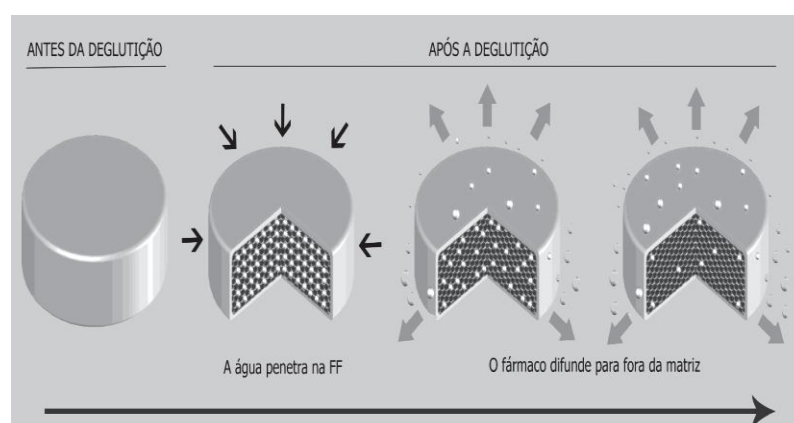


Figura 17 - Matriz insolúvel (Pezzini, 2007).

A base destes sistemas matriciais é constituída por composto lipídico que, quando postos em contato com os fluidos gastrointestinais, sofrem um processo de erosão, libertando o fármaco para o meio (**Figura 17**).

2.5.2.2.2. Matrizes Inertes

As matrizes inertes são também conhecidas como matrizes insolúveis, pelo fato de serem constituídas por polímeros insolúveis.

A estrutura da matriz inerte apresenta poros distribuídos de uma forma aleatória que comunicam através de canalículos estreitos (**Figura 18**).

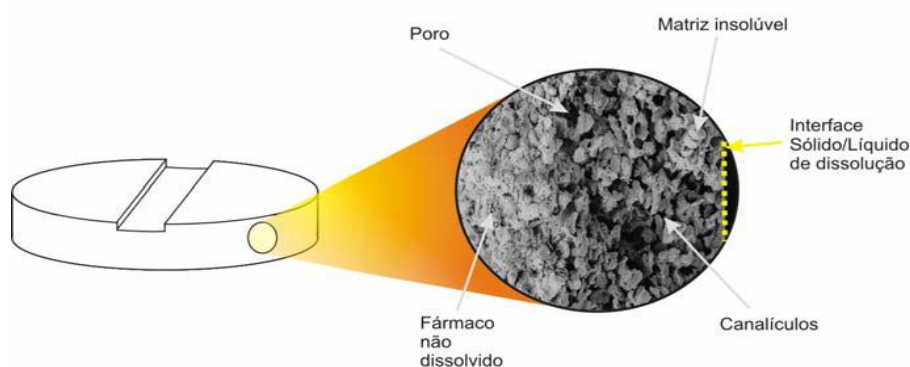


Figura 18 - Esquema representativo do interior de uma matriz inerte (Liberal, 2008).

Os comprimidos produzidos a partir de polímeros inertes formam sistemas que não são alterados pelo suco gástrico, sendo eliminados praticamente intactos. Isto explica “o ser inerte”, pois se trata não da inércia farmacológica, mas da inércia referente ao comportamento mecânico do polímero.

A liberação de fármacos através de matrizes inertes foi descrita e dividida em três etapas (Salomen & Doelker 1980):

1. Penetração dos líquidos de dissolução através de uma rede de poros interligados na estrutura matricial;
2. Dissolução do fármaco no interior da matriz;
3. Difusão lenta do fármaco dissolvido através de uma rede capilar formada pelos espaços vazios que ficam entre as partículas do polímero insolúvel.

Percebe-se que uma das principais vantagens tecnológicas destes sistemas é o fato do mecanismo de liberação não sofrer influência de agentes externos, tais como: a

composição dos sucos digestivos e a presença de agentes tensioactivos naturais (Liberal, 2008).

2.5.2.3. Sistemas com Membrana Porosa

Neste sistema o núcleo contendo o fármaco é revestido por uma membrana polimérica. O núcleo pode ser um comprimido, grânulo ou pélete. O fármaco é liberado por difusão através da membrana de revestimento. Este revestimento contém em pequena proporção, substâncias como laurilsulfato de sódio que, quando se dissolvem no líquido de dissolução, originam pequenos poros (Pezzini, 2007 e Lopes, 2006) (**Figura 19**).

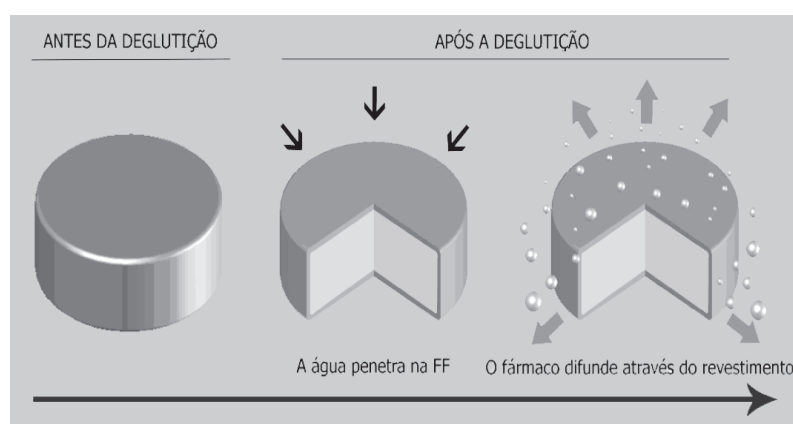


Figura 19 - Sistema reservatório: a água penetra na forma farmacêutica e dissolve o fármaco, o qual difunde através da membrana de revestimento presente na superfície da forma farmacêutica (Pezzini, 2007).

2.5.2.4. Sistema Osmótico

São sistemas que utilizam pressão osmótica para modular a liberação do fármaco. Nesse sistema a forma farmacêutica é constituída por um núcleo revestido por uma membrana semipermeável à água que tem um pequeno orifício, este orifício é feito por raios laser. Esse sistema é também conhecido por “push-pull” e está representado na **figura 20** (Pezzini, 2007).

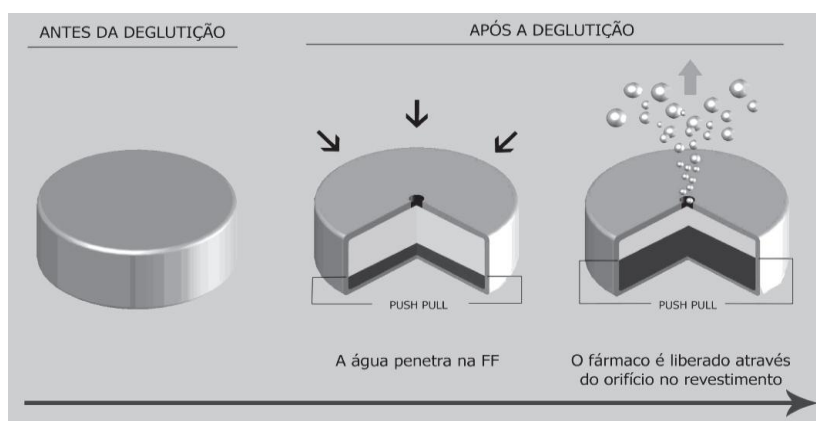


Figura 20 - Bomba osmótica "push-pull": a água penetra na forma farmacêutica por osmose, desintegra o núcleo e intumescce o polímero hidrofílico. A expansão da camada osmótica (polímero hidrofílico) promove a liberação do fármaco através do orifício (Pezzini, 2007).

2.5.2.5. Sistema de Liberação Retardada

O sistema de liberação retardada compreende as formulações que libertam o fármaco numa localização predeterminada, geralmente, o intestino. A principal vantagem deste sistema é a substância ativa estar protegido do ambiente hostil do estômago ou do intestino delgado, principalmente no que diz respeito à atividade enzimática.

As partes do intestino grosso mais favorável para absorver substâncias ativas são o cego e o colón ascendente, zonas onde os conteúdos são ainda fluidos, o que permite um melhor acesso da molécula de fármaco à parede intestinal (Coelho, 2007 e Liberal, 2008).

Este tipo de sistemas é especialmente usado no tratamento de patologias localizadas ao nível colónico, como a doença de Crohn e a colite ulcerosa.

2.5.2.5.1. Sistemas Entéricos

O revestimento entérico é possivelmente a forma de liberação modificada mais consagrada no âmbito das formas farmacêuticas de liberação modificada, quando em 1884, Unna utilizou revestimento de queratina para obter pílulas que não se desintegrassem no estômago (Prista, 2008).

A principal vantagem do revestimento entérico é prevenir a liberação de fármacos irritantes a mucosa gástrica ou que é sensível a acidez do estômago. Isto é possível revestindo a forma farmacêutica com um polímero fracamente ácido que contenha grupos carboxílicos ácidos, que permaneça intacto no estômago e que quando em contato com uma zona de pH mais elevado, por exemplo, intestino delgado, permita a liberação do fármaco (Liberal, 2008).

Os polímeros mais utilizados são os celulósicos e acrílicos. Dentre eles destacam-se os copolímeros dos ácidos metacrílicos e metilmetacrílico, conhecido popularmente como Eudragits. Os Eudragits, dependendo da sua composição, são insolúveis a valores de pH inferiores a 6 (Eudragit L) ou 7 (Eudragit S), dissolvendo-se rapidamente após a desproteção dos grupos carboxílicos a valores superiores de pH. Este fato permite explorar o aumento de pH que ocorre à medida que se vai avançando no trato gastrointestinal (Coelho, 2007).

2.6. Sistemas Farmacêuticos Gastrorretentivos

Os sistemas farmacêuticos gastrorretentivos são utilizados principalmente para fármacos que apresentam uma janela de absorção estreita. Proporcionando ao sistema permanecer na zona alvo por mais tempo possível. Estes sistemas também são utilizados para diminuir os efeitos secundários de fármacos irritantes e aumentarem a biodisponibilidade da droga (Baumgartner *et al.*, 2000).

Os sistemas farmacêuticos gastrorretentivos podem ser classificados da seguinte forma:

- Sistemas de alta densidade,
- Sistemas flutuantes,
- Sistemas expansíveis,
- Sistemas mucoadesivos,
- Sistemas magnéticos.

2.6.1. Sistemas de Alta Densidade

Os conteúdos gástricos apresentam uma densidade semelhante à água. Ao ser administrado sistemas farmacêuticos com uma densidade superior a 2,5 g/cm³ presume-se que os sistemas farmacêuticos ficam no fundo do estômago com tempo de residência gástrica prolongado (Aulton, 2008 e Coelho, 2007).

2.6.2. Sistemas Flutuantes

Estes sistemas são altamente promissores sendo amplamente encontrados na literatura. Neste sistema, o sistema farmacêutico flutua no suco gástrico ficando afastado do piloro. Estes sistemas são utilizados para diminuir os efeitos secundários de fármacos irritantes e aumentarem a biodisponibilidade da droga (Baumgartner *et al.*, 2000).

Várias técnicas podem ser utilizadas para alcançar o objetivo da flutuação, dentre elas sistemas hidrodinamicamente equilibrados, sistemas de baixa densidade e geradores de gás.

Os sistemas de equilíbrio hidrodinâmico são geralmente constituídos por polímeros hidrofílicos que intumescem quando em contato com soluções aquosas. A combinação de processos de intumescimento e de erosão da camada gelificada que se forma permite não só o controle da libertação do fármaco como a flutuação do sistema farmacêutico.

A formação de gás nos sistemas geradores de gás, geralmente ocorre pela produção de dióxido de carbono. O CO₂ é gerado pela reação dos carbonatos ou bicarbonatos com ácidos incorporados a formulação, como o ácido cítrico, ou com o suco gástrico.

Outra alternativa que também pode ser utilizada é a combinação de sistemas geradores de gás com sistemas hidrodinâmicos.

A pentoxifilina foi usada como droga modelo na investigação de matriz de comprimidos flutuantes, com o objetivo de aumentar a permanência gástrica, aumentar a biodisponibilidade e diminuir os efeitos secundários de irritação da droga. Foi estudada a força de compressão, as propriedades de flutuação *in vitro* e *in vivo* e liberação da droga. Os comprimidos continham hidroxipropilmetilcelulose (HPMC K4M), a droga e diferentes aditivos foram utilizados na compressão. Os resultados obtidos por Baumgartner, 2000 e equipe, demonstraram que a composição e a força de compressão têm grande influência nas propriedades flutuantes e na liberação da droga. A incorporação do agente gerador de gás (ácido cítrico e bicarbonato de sódio) com a celulose microcristalina, além de proporcionar uma boa flutuação (duração do estado latente de flutuação de 30 segundos e duração de flutuação > 8 horas), o conteúdo da droga também aumenta. A liberação da droga foi sustentada por mais de 8 horas. Os estudos radiológicos evidenciaram que os comprimidos não aderiram à mucosa do estômago e que tempo médio de retenção gástrica foi prolongado (>4 horas).

Os comprimidos flutuantes revestidos com multicamada, baseado na formação de gás foram desenvolvidos por Sungthongieen *et al.*, 2008. O sistema inédito consistiu de um núcleo contendo a droga e o comprimido revestido com uma camada protetora de hidroxipropilmetilcelulose, outra camada contendo uma substância formadora de gás, o bicarbonato de sódio e uma membrana para reter o gás (Eudragit RL 30D, RS 30D e NE 30D e etilcelulose), respectivamente. Os comprimidos apresentaram uma boa propriedade flutuante com tempo inicial de flutualidade de 7 minutos, flutuando por tempo maior que 8 horas.

Foi desenvolvido um revestimento de unidade-múltipla de flutuação de liberação sustentada em comprimidos de levodopa. O sistema foi proposto por Goole, 2008 e consistiu de um núcleo de 3 mm contendo a droga e um agente gerador de gás, preparado por granulação com derretimento, compressão subsequente e revestimento com uma membrana polimérica flexível. O Eudragit e ATEC foram usados como película anterior e um plastificante respectivamente. O nível de revestimento foi fixado em 20%

(p/p). A duração do estado latente de flutuação diminuiu na proporção que os agentes efervescentes aumentaram. Observou-se que a liberação sustentada da levodopa foi maior que 20 horas.

Comprimidos flutuantes e de liberação controlada da droga Captopril foram desenvolvidos por Martínez *et al.*, 2008, a partir de metolose SH 4000 SR e bicarbonato de sódio. Foram estudados dois diferentes níveis de compactação, cinética do volume de hidratação, tempo da matriz flutuante e a densidade da matriz. Os resultados demonstraram que a matriz compactada a 55 mPa flutua no meio de dissolução por mais de 8 horas, enquanto que a matriz compactada a 165 mPa flutua somente quando o bicarbonato de sódio está presente na formulação. O aumento da proporção do polímero da matriz aumenta o volume de hidratação maximal, bem como o tempo para alcançar este máximo. O volume das hidratações aumentou com a inclusão de bicarbonato de sódio na formulação. A densidade da matriz foi diminuída quando compactada a 55 mPa. O tempo de liberação da droga foi menor quando o bicarbonato de sódio estava incluído na formulação.

Para eliminar os períodos de latência, que podem levar ao esvaziamento gástrico nos sistemas geradores de gás, foram desenvolvidos sistemas de baixa densidade contendo óleos ou ar. Sendo os sistemas que contém ar os que oferecem melhores resultados.

Foi proposto por Losi *et al.*, em 2006 um sistema inovador, patenteado denominado de sistema Dome Matrix®, esse sistema consiste em dois comprimidos com uma face côncava e uma face convexa ligados entre si ocasionando a formação de uma câmara de ar no seu interior, proporcionando a flutuação do sistema. Nesse sistema os comprimidos são obtidos por compressão em máquinas de comprimir tradicionais, não necessitando de tecnologia especial além de punções especialmente desenhados para o efeito. O seu nome é derivado da semelhança que apresenta com as cúpulas das catedrais italianas “Duomo”.

Através de estudos radiográficos e cintográficos, Coelho, 2007 comprovou a flutualidade de comprimidos flutuantes de ranitidina utilizando o sistema Dome matrix®.

O sistema de liberação flutuante da droga basicamente flutua no fluido gástrico porque é menos denso quando comparado com a densidade do meio aquoso. Este sistema é desejável para drogas com uma janela de absorção no estômago ou na parte superior do intestino delgado como furosemida e teofilina (Singh & King 2000; Rouge *et al.*, 1996 e Sato *et al.*, 2004). O sistema de liberação flutuante da droga é também usado para drogas que atuam localmente na parte proximal do trato gastrointestinal, como antibióticos para erradicação de *Helicobacter pylori* usado no tratamento da úlcera péptica (Bardonnet *et al.*, 2006; Cooreman *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 1999 e Umamaheshwari *et al.*, 2003), para drogas que são instáveis no fluido intestinal como o captopril (Singh &

King 2000; Seta *et al.*, 1988 e Jain *et al.*, 2005) e drogas que exibem pouca solubilidade no trato intestinal como diazepam (Wurster *et al.*, 2003) e cloridrato de verapamil (Munday *et al.*, 2003).

Existem vários trabalhos publicados em revistas internacionais utilizando sistemas flutuantes para fármacos sintéticos com ação antihipertensiva, antiepiléptico, antiulceroso e de ação vascular periférica. Entretanto, não existe no mercado comprimidos flutuantes utilizando substâncias obtidas a partir de plantas (fitoterápicos). Motivo pelo qual foi desenvolvido o presente trabalho.

2.6.3. Sistemas Expansíveis

Uma das principais estratégias usadas para manter um sistema farmacêutico no estômago consiste em fazer com que o seu tamanho seja superior ao diâmetro do piloro durante a sua fase de maior expansão. Porém, torna-se impraticável a administração de sistemas farmacêuticos muito grandes, podendo ocasionar problemas na deglutição. O sistema ideal seria aquele inicialmente com tamanho pequeno e que posteriormente aumente de tamanho significativamente. Este objetivo foi alcançado ao ser desenvolvido sistemas desdobráveis e sistemas intumescíveis.

Os sistemas desdobráveis são constituídos por polímeros biodegradáveis, que são incorporados numa cápsula e que depois se desdobram no estômago.

O mecanismo de gastrorretenção dos sistemas intumescíveis baseia-se no mesmo princípio de retenção mecânica do sistema farmacêutico. De uma forma geral utilizam-se polímeros hidrofílicos que, quando postos em contato com soluções aquosas, absorvem água e aumentam de tamanho de forma considerável (Coelho, 2007).

2.6.4. Sistemas Bioadesivos

Os sistemas bioadesivos foram desenvolvidos com o objetivo de aderirem à mucosa gástrica ou à mucina, promovendo um aumento do seu tempo de permanência gástrica.

De acordo com o tipo de ligação entre os polímeros e a superfície mucino-epitelial pode ser classificado de diferentes formas:

Adesão mediada por hidratação;

Adesão mediada por ligações químicas (covalentes e iônicas), físicas ou mecânicas;

Adesão mediada por receptores.

2.6.5. Sistemas Magnéticos

Este sistema consiste na introdução de um íman no abdomen na posição anatômica do estômago e outro íman no interior do sistema farmacêutico. É um sistema promissor,

porém é necessária habilidade suficiente na colocação do íman exterior, podendo causar desconforto ao paciente (Coelho, 2007).

2.7. Conclusão

A protozoose amebíase constitui em um sério problema de saúde pública em todo o mundo, não está restrita apenas aos países considerados pobres, é possível detectá-la em todos os continentes. Assim sendo, o desenvolvimento de medicamento com atuação contra a *Entamoeba histolytica*, principalmente com ação luminal, nas amebíases intestinais é muito bem-vindo.

Os sistemas gastrorretentivos são bastante promissores e as diversas estratégias de gastrorretenção apresentadas são frequentemente combinadas para obter sistemas gastrorretentivos ainda mais eficazes. A combinação de um tempo de permanência gástrica adequada com um perfil de liberação de fármaco correto conduz a um aumento de biodisponibilidade deste, e conseqüentemente a uma maior eficácia da terapêutica.

Capítulo III

Cultivo, Coleta e Análises do Óleo Essencial da *Mentha crisper*

3.1. Coleta da Planta *Mentha crispa*

No desenvolvimento desta pesquisa foram utilizadas as partes aéreas da planta *Mentha crispa* L. (família Lamiaceae), coletada às 6 horas da manhã, com a planta no mesmo estágio de crescimento. Este horário está respaldado na literatura que demonstrou maior concentração do constituinte majoritário, o óxido de piperitenona (Silva, 2004). A planta é cultivada racionalmente sem uso de adubo químico, na região de Serra dos Cavalos, distrito da cidade de Caruaru – PE – Brasil (**Figura 21 e 22**).



Figura 21 - Cultivo da planta *Mentha crispa* na região Serra dos Cavalos no município de Caruaru, Pernambuco - Brasil.



Figura 22 - Coleta matinal (6h) de *Mentha crispa* na região de Serra dos Cavalos no município de Caruaru, Pernambuco - Brasil.

3.2. Obtenção do Óleo Essencial da Planta *Mentha crispa* e Hidrolato

As partes aéreas coletadas foram lavadas com água potável. Após lavagem todo material seguiu para o extrator industrial, utilizando o processo de hidrodestilação com uso de solvente orgânico (Figura 23).



Figura 23 - Etapa do processo de extração industrial do óleo essencial da planta *Mentha crispa* por hidrodestilação.

O óleo essencial da *Mentha crispa* obtido pelo processo de hidrodestilação foi acondicionado em frasco âmbar e, depois de cálculo do rendimento, armazenado a cerca de -5 °C.

Amostras do óleo essencial da *Mentha crispa* foram separadas e realizadas análises físico-químicas.

A parte aquosa, também conhecida como hidrolato de acordo com procedimento era desprezado, porém é sabido que em água os óleos voláteis apresentam a capacidade de aromatizar as soluções aquosas. Assim sendo, o hidrolato foi acondicionado em frasco âmbar e armazenado a cerca de -5 °C e amostras foram separadas para identificar/quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona.

3.3. Análises Físico-Químicas do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

3.3.1. Aspecto, Odor, Sabor e Cor do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

Análise visual, gustativa e olfativa.

3.3.2. Densidade do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

Foi aplicada a técnica do picnômetro presente na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição, 2010.

3.3.2.1. Descrição do Método

Utilizamos picnômetro limpo e seco, com capacidade de, no mínimo, 5 mL, que tenha sido previamente calibrado. A calibração consistiu na determinação da massa do picnômetro vazio e da massa de seu conteúdo com água, recentemente destilada e fervida, a 20 °C.

Colocou-se a amostra no picnômetro. Ajustou-se a temperatura para 20 °C removeu-se excesso da substância, e pesou-se. Obteve-se o peso da amostra através da diferença de massa do picnômetro cheio e vazio.

O quociente entre a massa da amostra líquida e a massa da água, ambas a 20 °C é a densidade relativa.

3.3.3. Índice de Refração do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

Utilizou-se um refratômetro de bancada da marca Hund Sugar.

3.3.4. Índice de Acidez do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

A análise do Índice de Acidez do óleo essencial de *Mentha crispa* foi determinada através da metodologia preconizada pela A. O. A. C. (1993).

3.3.5. Determinação dos Constituintes do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

O constituinte majoritário contido no óleo essencial foi identificado e quantificado através da técnica de Cromatografia de Fase Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM) e Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). O método analítico foi devidamente validado de acordo com a USP 34 e RE 899 de 29 de Maio de 2003 publicada no Diário Oficial da República Federativa do Brasil. O protocolo de validação encontra-se no apêndice I.

3.3.5.1. Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa (CG/EM)

3.3.5.1.1. Preparo da Curva Analítica

Pesou-se analiticamente cerca de 15 mg do padrão de referência de óxido de piperitenona. Transferiu-se para balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com acetato de etila (solução estoque, 300 µg/mL). A partir desta solução, foi preparada as demais concentrações de padrões em balões volumétricos de 10 mL conforme descrito na **tabela 4**.

Tabela 4 - Preparação das soluções padrão para construção da curva analítica.

Concentração Final (µg/mL)
15
30
60
150

3.3.5.1.2. Preparo da Amostra

Pesou-se analiticamente cerca de 4,3 mg de óleo essencial da *Mentha crispa*. Transferiu-se para balão volumétrico de 25 mL e completou-se o volume com acetato de etila. As condições cromatográficas encontram-se na **tabela 5**.

Tabela 5 - Condições cromatográficas da análise do ativo/marcador óxido de piperitenona por CG/EM.

Equipamento	CG/EM QP5050A Shymadzu
Gás	Hélio
Coluna	DB 5 J & W Scientific 30 x 0,25 mm x 0,25 mm
SIM para Íons	166, 138 e 67
Tempo	60 min
Vazão do Gás de Arraste	1,0 mL/min
Modelo Controle	Splitless

3.3.5.2. Determinação do Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da *Mentha crispa* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

3.3.5.2.1. Preparo da Amostra do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

Pesou-se 36,8 mg do óleo essencial da *Mentha crispa*. Transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Coletou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Filtrou-se com filtro de 0,45 µm. Injetou-se em HPLC.

3.3.5.2.2. Preparo do Padrão

Pesou-se cerca de 18,7 mg do padrão de referência do óxido de piperitenona e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol e

homogeneizou-se. Coletou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com metanol, homogeneizou-se e filtrou-se com filtro de 0,45 µm. Injetou-se três vezes em HPLC. As condições cromatográficas encontram-se abaixo.

3.3.5.2.3. Condições Cromatográficas

Equipamento: HPLC Merck Elite Modelo L 2200

Temperatura da coluna: 25 °C

Detector: 320 nm

Volume de injeção: 10 µL

Coluna: Coluna C18 Varian 150 x 4,6 mm

Coluna C18 Phenomenex 150 x 4,6 mm

Fluxo: 1 mL/min

Canal A: Solução diluente

Água purificada 69 mL

Ácido fórmico 1 mL

Metanol 30 mL

Canal B: Metanol

Tabela 6 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de teor do ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper*.

Tempo (min.)	Canal A (%)	Canal B (%)
0	100	0
6	75	25
20	60	40

3.4. Determinação do Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona no Hidrolato por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para esta análise foi aplicado o mesmo método analítico utilizado na análise do óleo essencial da *Mentha crisper*. As condições analíticas encontra-se no item 3.3.5.2.

3.5. Resultados e Discussão

3.5.1. Obtenção e Análises Físico-Químicas do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

O óleo essencial da *Mentha crispa* obtido por hidrodestilação apresentou um rendimento de 0,27%, este resultado é considerado baixo quando comparado ao rendimento obtido pela *Mentha pulegium* (5,2%). Porém considerado maior quando comparado ao encontrado em *Mentha crispa* (0,04%) por Pianowski, 2000. Isto pode ser explicado pelo fato que o teor do óleo essencial pode ser influenciado pelas práticas culturais, como número e hora do corte, idade da planta, além de fatores ambientais, tal como temperatura, umidade relativa, irradiação e fotoperíodo (Silva, 2004).

O resultado das análises físico-químicas do óleo essencial da *Mentha crispa* encontra-se na tabela abaixo. O óleo apresenta odor característico e sabor picante.

Tabela 7 - Resultados das análises físico-químicas do óleo essencial extraído das partes aéreas da *Mentha crispa* através de hidrodestilação.

Análises	Resultados
Aspecto	Líquido Límpido
Odor	Característico
Sabor	Picante
Cor	Amarelo Claro
Densidade	0,883 g/mL
Índice de Refração	1.4731
Índice de Acidez	0,44% KOH

3.5.2. Desenvolvimento do Método Analítico por CLAE para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da *Mentha crispa*

A análise quantitativa de óleos essenciais é realizada por cromatografia gasosa (CG). No entanto, durante o estudo da composição química do óleo essencial da *Mentha crispa* descobriu-se que seu constituinte majoritário, o óxido de piperitenona, um monoterpene oxigenado é solúvel em água e álcool etílico. A partir desta informação foi desenvolvido um método analítico por CLAE.

O desenvolvimento do método analítico consistiu na execução de vários testes. Dentre eles o teste de varredura em espectrofotômetro de ultravioleta. O resultado da análise

demonstrou que o óxido de piperitenona é absorvido no comprimento de onda de 320 nm de acordo com o espectro de varredura, **figura 24**.

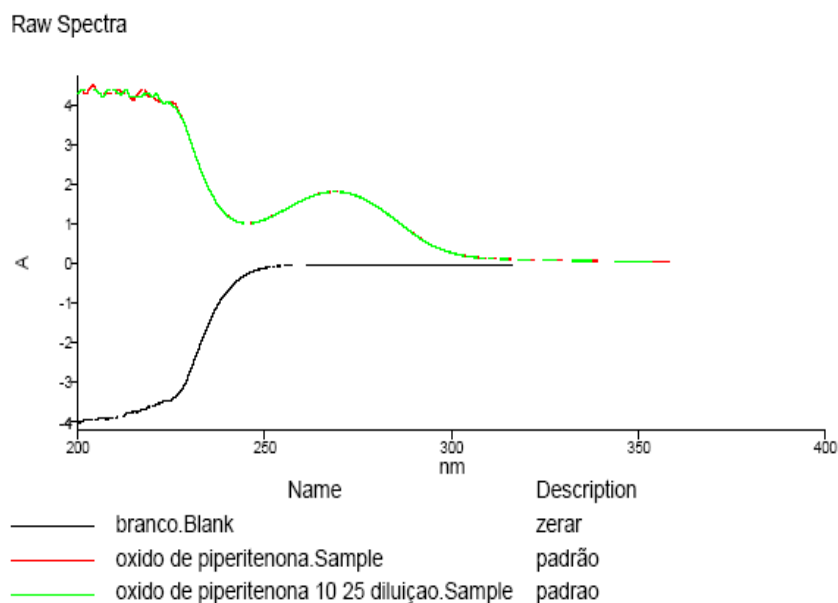


Figura 24 - Espectro de varredura da substância óxido de piperitenona no ultravioleta.

Para definição das condições cromatográficas foram realizados vários testes, com solventes diferentes em várias proporções e as condições analíticas que demonstraram resultados satisfatórios para validação analítica do método encontra-se no item 3.5.3.

A validação do método foi efetuada conforme protocolo de validação analítica elaborada de acordo com a USP 34, 2011. O resultado obtido nos testes de validação da metodologia analítica para quantificar o óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa* encontra-se no apêndice I.

3.5.3. Ensaio para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da *Mentha crispa*

O ensaio para determinar o constituinte majoritário do óleo essencial da *Mentha crispa*, o óxido de piperitenona, foi realizado através de dois métodos analíticos CG/EM e por CLAE.

3.5.3.1. Ensaio para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da *Mentha crisper* por CG/EM

Os cromatogramas obtidos no ensaio para quantificar o óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* por CG/EM apresentou um único pico, com tempo de retenção de 21 minutos (**Figura 25 e 26**).

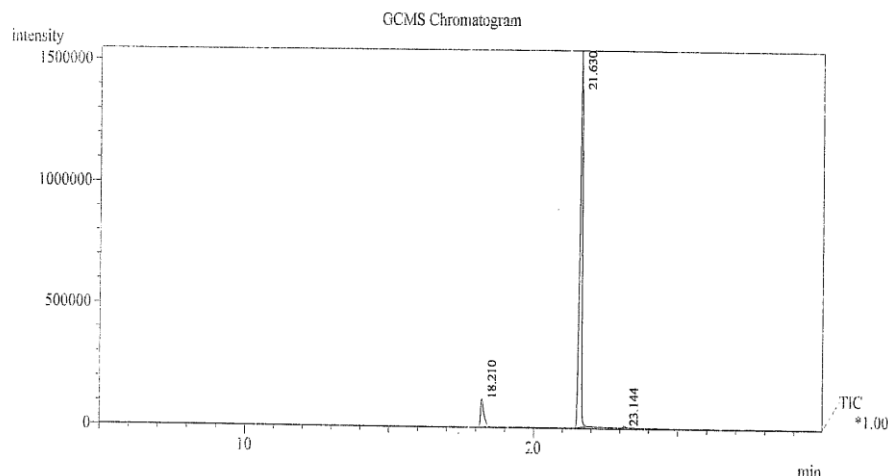


Figura 25 - Cromatograma do padrão de óxido de piperitenona obtido por CG/EM.

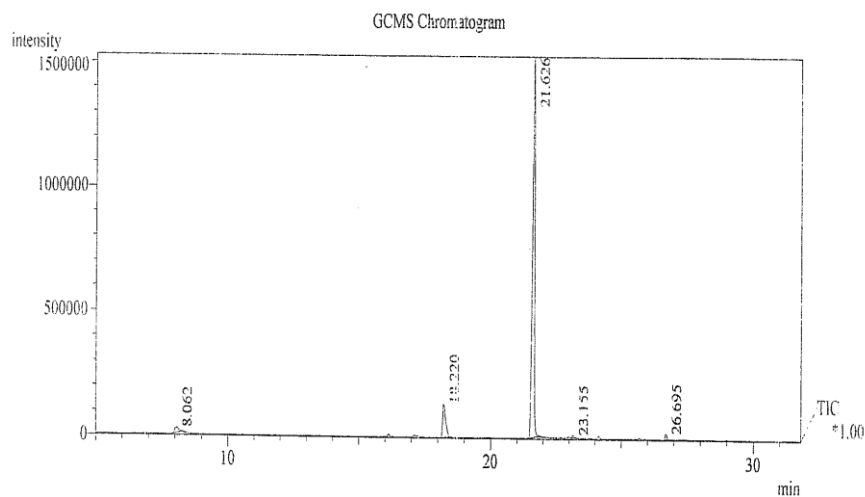


Figura 26 - Cromatograma do óleo essencial da *Mentha crisper* obtido por CG/EM.

3.5.3.2. Ensaio para Quantificar o Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da *Mentha crisper* por CLAE

Os cromatogramas obtidos no ensaio para quantificar o óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* por CLAE apresentou um único pico, com tempo de retenção de 11 minutos (**Figura 27 e 28**).

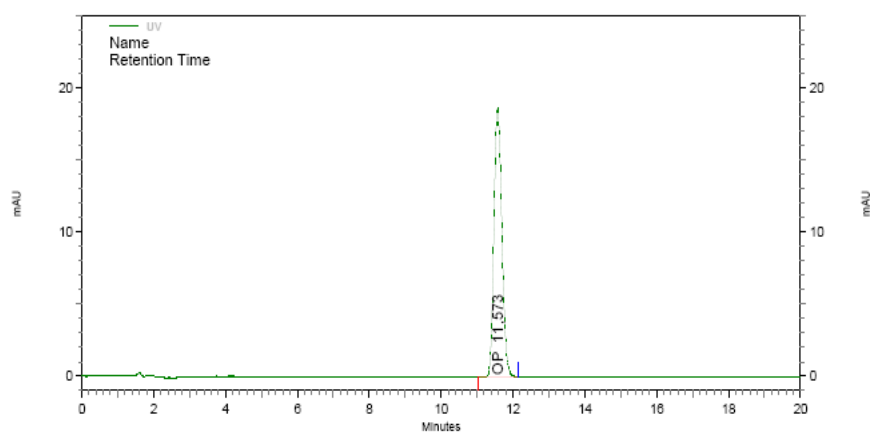


Figura 27 - Cromatograma do padrão do óxido de piperitenona obtido por CLAE.

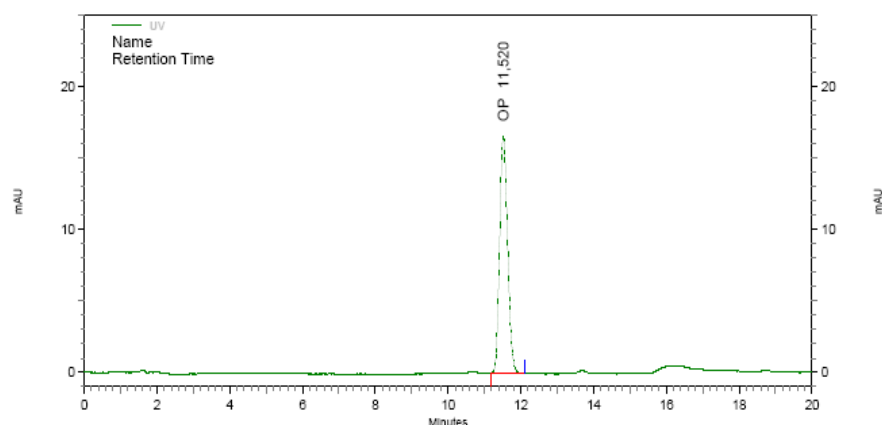


Figura 28 - Cromatograma do óleo essencial da *Mentha crispata* obtido por CLAE.

O resultado do ensaio para quantificar o óxido de piperitenona através da técnica da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) não variou significativamente quando comparado ao resultado obtido por cromatografia gasosa acoplada ao espectrofotômetro de massa (CG/EM), conforme se observa na **tabela 8**.

Tabela 8 - Resultado da análise quantitativa do óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispata*.

Método Analítico	Resultados (mg/mg)
CG/EM	0,49
CLAE	0,46

3.5.4 Ensaio para Identificar/Quantificar o Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona no Hidrolato

Os cromatogramas obtidos neste ensaio nos permitem afirmar que o pico apresentado no cromatograma da amostra do hidrolato é do óxido de piperitenona a partir da comparação do padrão. O cromatograma do hidrolato por CLAE apresentou um único pico, com tempo de retenção de 12 minutos (**Figura 29 e 30**).

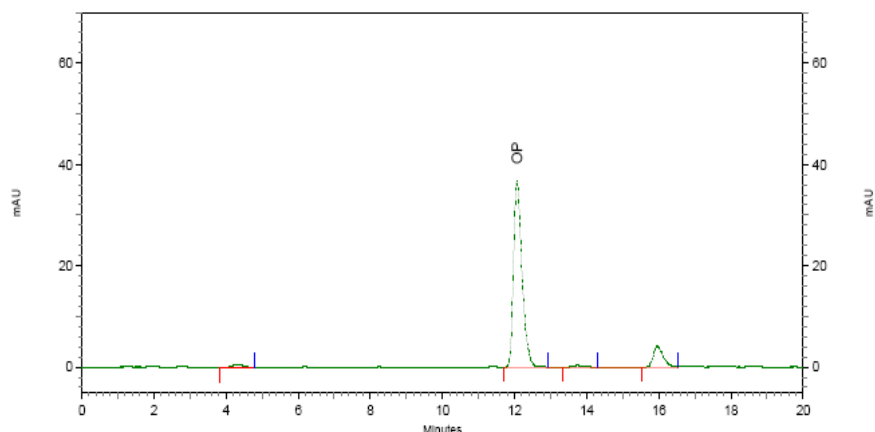


Figura 29 - Cromatograma do hidrolato obtido por CLAE.

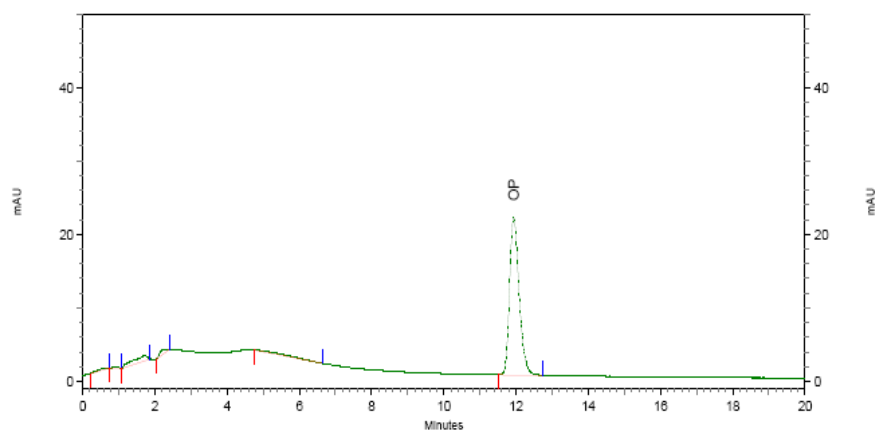


Figura 30 - Cromatograma do padrão do óxido de piperitenona obtido por CLAE.

O teor do ativo/marcador óxido de piperitenona encontrado no hidrolato foi de 0,26% (0,26 mg/g). Verifica-se que este resultado é considerado baixo quando comparado aos encontrado em *Mentha villosa* (93,62%) por Érica, 2008.

3.6. Conclusão

O método desenvolvido para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa* por CLAE, atende aos requisitos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade, intervalo e robustez de acordo com a USP 34, 2011. Este fato demonstra que o método desenvolvido e validado por CLAE pode ser aplicado para determinar o teor do constituinte majoritário do óleo essencial da *Mentha crispa*.

Na amostra do hidrolato está presente o ativo/marcador o óxido de piperitenona, porém em pequena concentração quando comparado ao óleo essencial da *Mentha crispa*. Esta informação é de grande importância, visto que, de acordo com o atual procedimento este material é desprezado. Assim sendo, a empresa deverá adotar um novo procedimento, considerando a possível utilização do hidrolato.

Capítulo IV

Avaliação da Atividade Amebicida e Tricomonicida do Óleo Essencial da *Mentha crisper*

4.1. Determinação da Atividade Amebicida e Tricomonicida, *in vitro*

O estudo da atividade amebicida e tricomonicida do óleo essencial das partes aéreas da *Mentha crispa* foi realizado de acordo com a percentagem de inibição do crescimento dos trofozoítos nas culturas, relativamente a um controle específico para cada ensaio.

4.1.1. Cepas Utilizadas

Para determinar a atividade amebicida do óleo essencial da *Mentha crispa* foi utilizada a cepa EGG de *E. histolytica*, originária de Manaus - Brasil, isolada em Agosto de 1988 de paciente do sexo masculino, 35 anos, portador de colite disentérica e abscesso hepático. As cepas vêm sendo mantidas no Laboratório de Amebíase nas dependências da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), em cultivo axênico em tubos de vidro estéreis (Pyrex®) contendo 13 mL de meio. Para o cultivo das amebas foi utilizado o meio YI-S (Diamond *et al.*, 1995).

Os repiques, para manutenção foram feitos a cada 72/96 horas. As culturas foram observadas em microscópio invertido, com objetiva de 100X, avaliando crescimento, atividade e aderência dos trofozoítos à parede do tubo. Os tubos que apresentarem bom crescimento dos trofozoítos foram invertidos várias vezes e rolados entre as palmas da mão, para o desprendimento de parte dos trofozoítos aderidos. Um volume de aproximadamente 0,2 a 0,5 mL da suspensão de trofozoítos foi transferido para um tubo de vidro (10 x 100 mm ou 16 x 120 mm) contendo meio novo, pré-aquecido em banho-maria a 37 °C, por 10 minutos. Após o repique, os tubos foram mantidos em estufa bacteriológica a 37 °C.

Para avaliar a atividade tricomonicida do óleo essencial da *Mentha crispa* foi utilizada a cepa JT de *T. vaginalis*, originária do Rio de Janeiro, Brasil, isolada em 1979 de um paciente do sexo feminino, 40 anos, sintomático. Trofozoítos desta cepa cresceram em tubos de vidro em meio estéril, YI-S-32, em estufa bacteriológica a 37 °C. Repiques a cada 48-72 horas garantiram a manutenção do parasita em fase exponencial de crescimento para utilização nos ensaios de atividade tricomonicida.

1.0 Preparação da solução para ensaio de atividade

1.1 Pesou-se 34,4 mg de óleo essencial da *Mentha crispa* e dissolveu-se em 500 µL de DMSO retirou-se uma alíquota de 100 µL e completou-se o volume para 5 mL com meio de cultura.

1.2 Filtrou-se com filtro de 0,22 µm.

1.3 Preparou-se diluições nas seguintes concentrações com meio de cultura:

1. 0,25 mg/mL
2. 0,125 mg/mL
3. 0,0625 mg/mL
4. 0,03125 mg/mL
5. 0,015625 mg/mL
6. 0,0078125 mg/mL
7. 0,00390625 mg/mL

4.1.2. Padronização do Inóculo

Para a padronização do inóculo, tubos de vidro estéreis contendo trofozoítos em fase logarítmica de crescimento, foram mantidos em banho de gelo durante 20 minutos e, posteriormente, homogeneizados a fim de facilitar o desprendimento dos mesmos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 7 minutos a 1500 rpm. Parte do sobrenadante foi descartada e os precipitados obtidos foram concentrados em único tubo. A quantificação da suspensão de trofozoítos foi realizada em câmara de Neubauer, utilizando a técnica de contagem de leucócitos adaptada (Carvalho & Silva 1988) e o corante vital eosina (0,125%). Resumidamente, 40 µL da suspensão de trofozoítos, foram transferidos para “eppendorfs” contendo 160 µL de eosina. Após homogeneização, uma alíquota desse conteúdo foi depositada sob os retículos da câmara, evitando excesso de líquido e bolhas de ar. A contagem dos parasitos presentes na câmara foi executada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E100) no aumento de 10X. O cálculo do número de trofozoítos/mL foi efetivado empregando a seguinte equação:

$$Z = Fc \times Fd \times Y$$

Onde:

Z = número de trofozoítos por mililitro (mL) de suspensão;

Fc = fator de correção da Câmara de Neubauer (2.500);

Fd = fator de diluição utilizado durante a contagem;

Y = número de trofozoítos contados nos quatro quadrantes laterais da câmara.

Para a seleção do inóculo ideal, diferentes concentrações de trofozoítos, em triplicata, foram testadas (40.000/mL, 60.000/mL e 80.000/mL). Após 48 h de incubação em estufa

bacteriológica a 37 °C, cada cultura foi analisada em microscópio invertido (Olympus IX51), verificando seu crescimento, mobilidade e aderência.

Fato este não observado para amebas que não apresentaram boa aderência as placas dificultando a quantificação pelo método colorimétrico que será descrito abaixo.

4.1.2.1. Determinação da Percentagem de Inibição

Após o ensaio de inibição, os trofozoítos não aderidos foram retirados com o auxílio de uma pipeta de vidro e cada poço foi lavado, cuidadosamente, duas vezes com salina tamponada pH 7,2 (PBS). Em seguida, os trofozoítos aderidos à placa foram fixados com metanol PA por 15 minutos. Após nova lavagem com salina tamponada pH 7,2, para retirar o excesso de metanol, os trofozoítos foram coradas com azul de metileno 0,1% em tampão borato 0,1 M pH 8,7, por 10 minutos. O excesso de corante foi removido por meio de lavagens sucessivas dos poços com solução de tampão borato 0,01 M pH 8,7, e o corante incorporado pelos trofozoítos foi extraído pela adição de 500 µL de solução de ácido clorídrico 0,1 M em cada orifício, por 10 minutos.

Alíquotas de 100 µL, de cada poço, foram então transferidas para placa de ELISA de 96 poços e levadas ao leitor de ELISA (BIO-RAD modelo 3550). A leitura foi realizada em 655 nm (Busatti & Gomes, 2007).

A inibição do crescimento dos trofozoítos foi expressa em porcentagem utilizando a seguinte equação:

$$\text{Porcentagem de inibição} = [1 - (A_{655} \text{ teste} \div A_{655} \text{ controle negativo})] \times 100$$

Sendo:

A_{655} = absorbância a 655 nm.

A_{655} controle negativo = absorbância do controle negativo.

A_{655} teste = absorbância referente à ação do nitroimidazol.

4.1.2.2. Ensaio de Inibição do Crescimento de *Entamoeba histolytica*

Foi utilizado o metronidazol na padronização da técnica de determinação da IC₅₀. Este fármaco é amplamente prescrito no mundo e é usado em muitos experimentos de atividade amebicida. O metronidazol (20 mg) foi dissolvido diretamente em 1 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo-se solução de 20 mg/mL. Alíquota de 200 µL desta solução foi diluída em meio de cultura YI-S-32 para um volume final de 10 mL, obtendo-se concentração final de 0,4 mg/mL. A solução preparada foi, posteriormente, filtrada em membrana esterilizante de nitrocelulose (0,22 µm) e alíquotas desta foram adicionadas a tubos de vidro contendo trofozoítos de *E. histolytica* (inóculo previamente padronizado) e

meio de cultura a fim de obter concentrações finais variando de 0,4 a 12,8 µm, em um volume final de 6 mL.

Do mesmo modo, o óleo essencial de *M. crisper* foi adicionado, separadamente, a novos tubos contendo trofozoítos de *E. histolytica* e meio de cultura, a fim de obter concentrações finais variando de 0,25 mg a 0,00390625 mg/mL em um volume final de 6 mL para amebas.

Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 37 °C durante intervalos de 24 e 48 h. Após os períodos de incubação, a viabilidade foi verificada qualitativamente em microscópio invertido observando-se a mobilidade e aderência dos trofozoítos. Para a determinação da IC₅₀ os trofozoítos foram quantificados através da técnica de contagem de leucócitos adaptada (Carvalho & Silva, 1988), detalhada anteriormente no item 4.1.2. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos pelo menos duas vezes. Foram utilizado controle negativo (somente trofozoítos), controle positivo (MTZ) e controle de DMSO (0,5%).

4.1.2.3. Ensaio de Inibição do Crescimento de *T. vaginalis*

Foi utilizado o mesmo método descrito no item 4.1.2.2.

4.2. Avaliação da Atividade Amebicida *in vivo* do Óleo Essencial da *Mentha crisper*

Inicialmente procuramos obter infecções luminiais de hamsters e gerbils por gavagem com 1 x 10⁶ trofozoítos de *E. histolytica*, porém não obtivemos sucesso. Infecções invasivas foram obtidas por inoculação diretamente no fígado de 1 x 10⁶ trofozoítos (**Figura 31**). Este modelo para avaliação da atividade amebicida é aplicável a amebíase extraintestinal, invasiva. Foram usados Gerbils (*Meriones unguiculatus*) como modelo experimental por constituir o mais susceptível à amebíase hepática.

Os tubos contendo *Entamoeba histolytica* (cepa EGG) foram deixados no gelo por 20 min. Posteriormente os tubos foram agitados e centrifugados por 7 minutos a 1500 rpm para concentração do inóculo.

Por laparotomia, foi inoculado 1 x 10⁶ trofozoítos de *Entamoeba histolytica* no lobo direito de cada animal em 0,2 mL de meio de cultura.

Os animais inoculados foram tratados durante 7 dias com dose única do óleo essencial de *M. Crisper* numa concentração muito maior que sua IC₅₀ (40,0 mg/Kg).

Foram utilizados Gerbils machos pesando 200-250 g, separados aleatoriamente em 02 grupos (n=7 animais/grupo), sendo 7 animais do grupo controle e 7 do grupo teste. Os animais foram tratados no mesmo dia em que foi realizada a infecção, perdurando por 7 dias o tratamento. Durante o tratamento, o grupo controle recebeu o meio de cultura YI-S-

32. No sétimo dia, após o tratamento, os animais foram sacrificados e seus fígados avaliados.

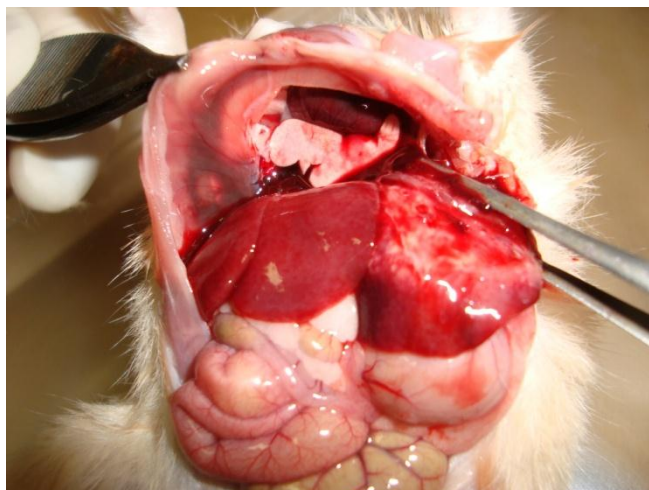


Figura 31 - Fígado de Hamster infectado com cepa EGG de *E. histolytica*

4.3. Resultados e Discussão

4.3.1. Determinação da Atividade Amebicida e IC₅₀, *in vitro*, Frente a *E. histolytica*

Na determinação da IC₅₀ para o óleo de *Mentha crisper* em relação à *E. histolytica*, inicialmente descreveu-se a relação existente entre a concentração do óleo essencial de *Mentha crisper* e o percentual de inibição que ele causa no protozoário avaliado. Para tanto, construiu-se a **figura 32**, que apresenta o gráfico de dispersão entre o percentual de inibição e a concentração de óleo essencial de *Mentha crisper*.

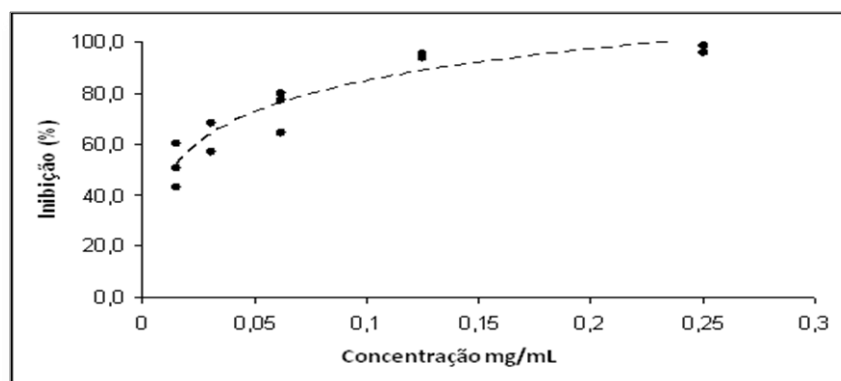


Figura 32 - Gráfico de dispersão (Inibição x Concentração).

A partir da observação da **figura 32**, percebe-se que a relação entre concentração do óleo essencial da *Mentha crispa* e o percentual de inibição não se aproxima de uma relação linear. Importante salientar ainda que a relação existente entre essas duas variáveis apresenta uma curvatura próxima da curva exponencial.

Sendo assim, a obtenção do modelo de regressão se torna inviável, trabalhando com os dados na sua forma natural. De acordo com a relação sugerida pela **figura 32**, pode-se transformar a relação em linear tomando o logaritmo natural da variável concentração. A **figura 33**, descrita a seguir, apresenta os resultados obtidos.

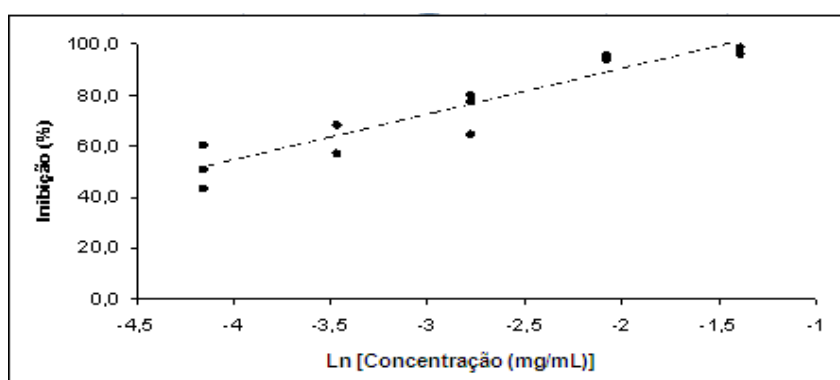


Figura 33 - Gráfico de dispersão (Inibição x Logaritmo [Concentração]).

Observe que parece existir uma relação linear entre a Inibição e o logaritmo da concentração do derivado vegetal avaliado. Esses resultados nos permitem trabalhar com o modelo de regressão linear. Assim, o próximo passo foi o de estimar a relação existente entre a variável resposta, o percentual de inibição, e o logaritmo da variável explicativa, a concentração do derivado vegetal, através da reta de regressão, obtida pelo modelo de regressão. Essa transformação foi feita de forma a permitir o ajuste de um modelo linear, sendo que para apuração dos resultados será feita a transformação inversa.

Construiu-se o teste de significância do modelo (ANOVA) com o objetivo de identificar se a concentração do óleo essencial da *Mentha crispa* influencia de forma significativa na variável resposta, o percentual de inibição. Observe pela **tabela 9**, a existência de uma probabilidade de significância igual a 0,023, indicando que existem fortes evidências de que a concentração do óleo essencial da *Mentha crispa* impacta de forma significativa no percentual de inibição, mostrando o ajuste do modelo aos dados.

Tabela 9 - Modelo de regressão final (Óleo essencial da *Mentha crispa*).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coefficientes	P-valor (Coefficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=108,4$	< 0,001	0,238	0,023
	Logaritmo (Concentração)	$\beta_1=9,5$	0,023		

Percentual de inibição = $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Logaritmo (Concentração)}$.

Observe que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos, sendo a probabilidade de significância do teste, p-valor menor que 0,05, o que mostra que o logaritmo da concentração do óleo essencial da *Mentha crispa* é importante para explicar o percentual de inibição da *E. histolytica*. O valor positivo do coeficiente angular indica que quanto maior a concentração do derivado vegetal, maior será o percentual de inibição.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido foi de 0,238, mostrando que aproximadamente 24% da variabilidade da resposta, o percentual de inibição, foi explicada pelo logaritmo da concentração do derivado vegetal. Os outros 76,2% podem ser explicados por outros fatores não contemplados neste estudo. Esse valor também é considerado satisfatório, tendo em vista as limitações do estudo, principalmente no que diz respeito ao controle das diversas variáveis do estudo. O desvio padrão do modelo ajustado é de 16,6%.

Do modelo final obtido não foram encontrados *outliers*. Assim, passou-se para validação do modelo obtido. A análise dos resíduos mostra que estes possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, são independentes e normalmente distribuídos, $p>0,05$. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

A etapa final consiste em estimar o valor do IC_{50} , ou seja, a concentração do óleo essencial da *Mentha crispa* que produz a redução da população de *E. histolytica* em 50%. Para tanto, utilizou-se a técnica de regressão inversa (Werkema, 2006). A equação de regressão obtida a partir dos experimentos é descrita a seguir.

$$\text{Inibição}(\%) = 108,4 + 9,5 \cdot \text{Ln}(\text{Concentração})$$

Com esta equação é possível determinar qual a concentração de derivado vegetal é necessária para reduzir a população deste protozoário em 50%, substituindo o valor de inibição desejado na equação. Assim, a equação para estimar a concentração é descrita a seguir.

$$Concentração(Mentha Crispa) = \exp\left(\frac{Inibição - 108,4}{9,5}\right)$$

Utilizando a fórmula descrita, substituindo a Inibição por 50, conclui-se que o valor da IC₅₀ estimado para o óleo essencial da *Mentha crispera* é de 0,022 (mg/mL). O erro padrão para o IC₅₀ estimado foi 1,5 (µg/mL), de acordo com o modelo encontrado. Para uma estimacão mais precisa, torna-se necessário a construçao do intervalo de confianca para a concentraçao do óleo essencial da *Mentha crispera* necessaria para reduçao da populaçao desse protozoário em 50%. Estes resultados são apresentados a seguir pela **tabela 10**, que mostra o IC₅₀ estimado bem como seu intervalo com 90% e 95% de confianca.

Tabela 10 - Estimativa intervalar do IC₅₀.

Derivado Vegetal	IC ₅₀ (mg/mL)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
Óleo Essencial da <i>Mentha crispera</i>	0,02	95 %	0,0002	0,0294
		90 %	0,0003	0,0184

Assim, conclui-se que a concentraçao do óleo essencial da *Mentha crispera* necessaria para reduçao de 50% da populaçao de *E. histolytica* é de 0,02 (mg/mL) variando de 0,0002 a 0,0294 com 95% de confianca, de acordo com o modelo de regressao estimado. Considerando-se uma confianca de 90% esse intervalo passa a ser de 0,0003 a 0,0184.

4.3.2. Determinaçao da Atividade Tricomonica e IC₅₀, *in vitro*, Frente a *T. vaginalis*

Para determinacão da IC₅₀ do óleo essencial da *Mentha Crispera* em relaçao à *T. vaginalis*, o primeiro passo foi identificar a relaçao existente entre a concentraçao do derivado vegetal e o percentual de inibicão causado pelo mesmo. Para tanto, construiu-se a **figura 34**, que apresenta o gráfico de dispersao entre o percentual de inibicão e a concentraçao do óleo essencial da *Mentha Crispera*.

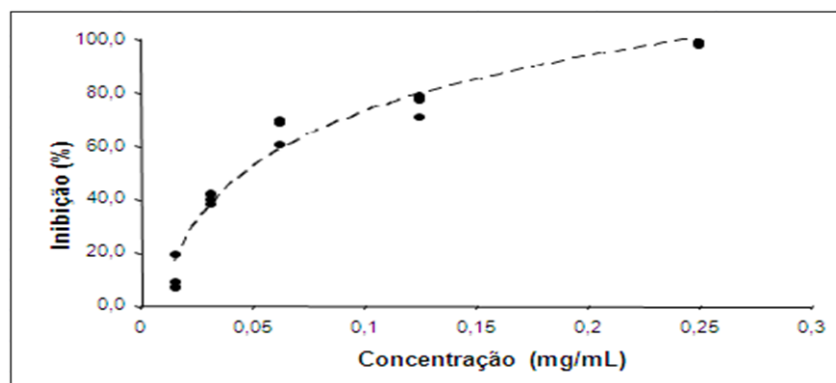


Figura 34 - Gráfico de dispersão (Inibição x Concentração).

A análise da **figura 34** nos permite observar que a relação existente entre concentração do óleo essencial da *Mentha Crispa* e o percentual de inibição não é linear. Observe ainda que a relação existente entre essas duas variáveis apresenta uma curvatura próxima da curva exponencial, corroborando com outros estudos apresentados sobre o assunto, que utilizam outras drogas.

Esses resultados inviabilizam a obtenção do modelo de regressão linear para os dados em sua forma natural. Sendo assim, torna-se necessário fazer uma transformação nos dados de forma a tornar esta relação linear. Seguindo a sugestão da **figura 34**, uma forma natural de tornar a relação observada em linear consiste em tomar o logaritmo natural (Logaritmo) da variável concentração. A **figura 35**, descrita a seguir, mostra esses resultados.

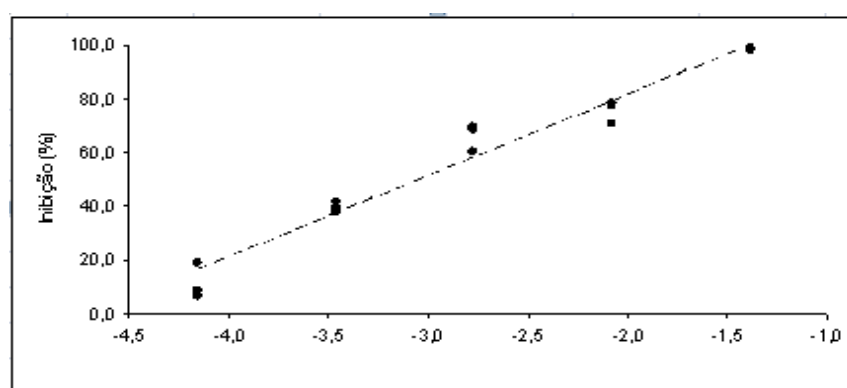


Figura 35 - Gráfico de dispersão (Inibição x Logaritmo [Concentração]).

Note-se, pela **figura 35**, que agora parece existir uma relação linear entre a Inibição e o logaritmo da concentração do derivado vegetal. A partir desses resultados, o próximo passo consistiu em estimar a relação existente entre a variável resposta, o percentual de

inibição, e o logaritmo da variável explicativa, a concentração do derivado vegetal, através da reta de regressão, obtida pelo modelo de regressão. Essa transformação foi realizada de forma a permitir o ajuste de um modelo linear, sendo que para apuração dos resultados será feita a transformação inversa.

Inicialmente construiu-se o teste de significância do modelo (ANOVA) para identificar se a concentração do óleo essencial da *Mentha Crispa* influencia de forma significativa na variável resposta, o percentual de inibição. De acordo com a análise de variância, observou-se uma probabilidade de significância menor que 0,001, o que mostra que existem fortes evidências de que a concentração do derivado vegetal supracitado impacta de forma significativa na inibição, mostrando o ajuste do modelo aos dados. O modelo obtido é apresentado na **tabela 11**, descrita a seguir.

Tabela 11 - Modelo de regressão final (Óleo essencial da *Mentha Crispa*).

Variável Resposta	Variável Explicativa	Coeficientes	P-valor (Coeficientes)	R ² Ajustado	P-valor (ANOVA)
Percentual de Inibição	Constante	$\beta_0=142,1$	< 0,001	0,961	0,001
	Logartmo (Concentração)	$\beta_1=30,2$	< 0,001		

Percentual de Inibição = $\beta_0 + \beta_1 \cdot \text{Logaritmo (Concentração)}$.

A partir da análise da **tabela 11**, observa-se que tanto o intercepto (β_0) quanto o coeficiente angular (β_1) ajustados foram significativos, p-valor menor que 0,05, mostrando que o logaritmo da concentração do óleo essencial da *Mentha Crispa* é importante para explicar o percentual de inibição do *T. vaginalis*. O valor positivo do coeficiente angular indica que quanto maior a concentração do derivado vegetal, maior será o percentual de inibição.

O coeficiente de determinação ajustado (R^2 aj.) obtido para o modelo foi de 0,961, mostrando que 96,1% da variabilidade da resposta, o percentual de inibição, é explicado pelo logaritmo da concentração do derivado vegetal. Os outros 3,9% são explicados por outros fatores não contemplados neste estudo. Esse valor é considerado satisfatório. O desvio padrão do modelo ajustado é de 6,2%.

Para identificação dos *outliers* do modelo de regressão, considerou-se como tal, resíduos do modelo, cujo valor deve ser no máximo 2,5 em módulo. Um resíduo é a diferença entre o valor real da variável resposta e o valor estimado pela reta de regressão (Werkema, 2006). Do modelo final obtido não foram encontrados *outliers*. Assim, passou-se para validação do modelo obtido.

A validação do modelo obtido é feita através da análise de resíduos. O modelo de regressão é construído sobre as suposições de que os resíduos são normalmente distribuídos, independentes uns dos outros e com variância constante em torno da média 0. A análise dos resíduos mostra que estes possuem variância aproximadamente constante em torno da média 0, são independentes e normalmente distribuídos, $p > 0,05$. Assim, conclui-se que o modelo é adequado.

Como o modelo se mostrou adequado, a etapa final foi estimar o valor da IC_{50} , ou seja, a concentração do óleo essencial da *Mentha Crispa* que produz a redução da população de *T. vaginalis* em 50%. Para tanto, utilizou-se a técnica de regressão inversa, conhecida também como calibração (Werkema, 2006). A equação de regressão obtida a partir dos experimentos é descrita a seguir.

$$Inibição(\%) = 142,1 + 30,2 \cdot \ln(Concentração)$$

A partir da equação descrita anteriormente é possível determinar a concentração que produz um determinado percentual de inibição, substituindo o valor de inibição desejado na equação. Assim, a equação para estimar a concentração é descrita a seguir.

$$Concentração(Mentha Crispa) = \exp\left(\frac{Inibição - 142,1}{30,2}\right)$$

Substituindo a inibição por 50 na equação acima, conclui-se que o valor da IC_{50} estimado para o óleo essencial da *Mentha Crispa* é de 0,05 (mg/mL). O erro padrão para a IC_{50} estimada foi 1,1 (μ g/mL), de acordo com o modelo encontrado. Para uma estimativa mais precisa, torna-se necessário a construção do intervalo de confiança para a concentração do óleo essencial da *Mentha Crispa* necessária para redução da população desse protozoário em 50%. A **tabela 12**, descrita a seguir, apresenta o valor estimado para o IC_{50} bem como seu intervalo com 90% e 95% de confiança.

Tabela 12 - Estimativa Intervalar do IC_{50} .

Derivado Vegetal	IC_{50} (mg/mL)	Intervalo de Confiança	Inferior	Superior
Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	0,05	95 %	0,04	0,06
		90 %	0,04	0,06

A partir da análise da **tabela 12** é possível concluir que a concentração do óleo essencial da *Mentha Crispa* necessária para redução de 50% da população de *T. vaginalis* é de 0,05 (mg/mL) variando de 0,04 a 0,06 com 95% de confiança, de acordo com o modelo de regressão estimado. Considerando-se uma confiança de 90% esse intervalo continua o mesmo.

4.3.3. Avaliação da Atividade Amebicida, *in vivo*, do Óleo Essencial da *Mentha crispa*

As lesões nos animais tratados não apresentaram diferenças significativas dos animais controles.

4.4. Conclusão

A *M. crispa* apresentou excelente atividade amebicida ***in vitro***, justificando sua avaliação ***in vivo***, apesar dos modelos não serem ideais. Considerando que a amebíase é uma infecção luminal e invasiva. Ou seja, muitos indivíduos infectados assintomáticos são presumidos de portarem a ameba somente no lúmen intestinal. Já as infecções sintomáticas são presumidas por ocorrer invasão da submucosa intestinal causando amebíase invasiva intestinal, podendo também ocorrer amebíase extraintestinal, sendo o fígado o órgão mais acometido. Procuramos determinar a efetividade do óleo essencial da *M. crispa* em infecções experimentais por *E. histolytica* invasiva e luminal. As infecções invasivas foram produzidas em fígado de hamsters. As lesões nos animais tratados não apresentaram diferenças significativas dos animais controles, sugerindo que o óleo essencial da *M. crispa* não atuaria sistemicamente. Apesar de não existirem até o momento modelos experimentais para amebíase luminal, tentamos produzir infecções luminiais em hamsters e gerbils por gavagem de trofozoítos. Todas as tentativas fracassaram e não pudemos confirmar nossa expectativa de que o óleo essencial da *M. crispa* atuaria em nível da luz intestinal nestes animais.

O óleo essencial da *Mentha crispa* apresentou ***in vitro*** uma boa atividade tricomonicida, e IC₅₀ 0,05 mg/mL. Estes resultados indicam a possibilidade do uso do óleo essencial da *Mentha crispa* como uma terapia alternativa na tricomoníase, porém é necessária a realização de testes ***in vivo*** para comprovação desta atividade. Contudo, até o momento não existem modelos bem estabelecidos para tricomoníase experimental.

Capítulo V

Preparação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um
Parasiticida

5.1. Preparação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

Os sistemas matriciais hidrófilos são dos sistemas mais utilizados para o desenvolvimento de formas farmacêuticas de liberação modificada, em virtude de sua produção não necessitar de equipamento especial, bem como apresentar elevada versatilidade. Dessa forma, neste trabalho foi utilizado o HPMC K4M e um agente formador de gás, o ácido cítrico com bicarbonato de sódio na produção dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

5.1.1. Materiais

HPMC K4M (Colorcon)

Óleo essencial da *Mentha crisper*

Lactose spray dry

Celulose microcristalina 101

Celulose microcristalina 102

Celulose microcristalina 200

Talco

Estearato de magnésio

Ácido cítrico

Bicarbonato de sódio

5.1.2. Equipamentos

Misturador em “V” Alwis capacidade 5 Kg

Compressora Automática MN3-F Neuberguer com 16 punções

Balança Ohaus

Balança Toledo

Gral de porcelana com pistilo

5.1.3. Preparação dos Comprimidos

Na preparação dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida foi utilizada a técnica da compressão direta. O óleo essencial da *Mentha crisper* foi incorporado ao aerosil e juntamente com as outras matérias-primas foram introduzidas no misturador em “V” e misturadas por determinado tempo. Em seguida o pó foi colocado no alimentador da compressora automática com 16 punções de 19 mm com formato oblongo. A força de compressão foi de 8 toneladas. As quatro diferentes formulações foram preparadas da mesma forma, mudando apenas os excipientes. Seriam produzidas cinco formulações com diferentes concentrações do HPMC K4M e

excipientes. Em virtude de troca de substâncias durante a preparação, a formulação identificada como A3 foi descartada.

5.1.4. Verificação dos Comprimidos

Os comprimidos produzidos foram examinados visualmente, nomeadamente no que diz respeito ao exame de superfície para detectar irregularidades. As dimensões dos comprimidos (diâmetro e espessura) foram determinadas em dez comprimidos usando um paquímetro.

Na **tabela 13** encontram-se as formulações produzidas a partir do hidroxipropilmetilcelulose (HPMC K4M).

Tabela 13 - Fórmulas em percentual dos comprimidos produzidos com HPMC K4M.

Matéria-prima	Formulação A1 (%)	Formulação A2 (%)	Formulação A4 (%)	Formulação A5 (%)
HPMC K4M	43,5	30	40	30
Óleo Essencial da <i>M. crista</i>	2,5	2,5	2,5	2,5
Celulose 102	41,2	54,7	20	-
Talco	2,0	2,0	3	2,0
Lactose Spray Dry	-	-	23,72	-
Celulose 200	-	-		54,7
Ácido Cítrico anidro	3,89	3,89	3,89	3,89
Bicarbonato de Sódio	3,89	3,89	3,89	3,89

Os testes realizados nos comprimidos estão descritos a seguir.

5.1.5. Produção dos Comprimidos para Estudos Radiográficos

Os comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida para os estudos radiográficos em cães foram preparados conforme se apresenta na **tabela 14**.

Tabela 14 - Fórmula em mg dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida preparados para os estudos radiográficos.

Matéria-Prima	Quantidade para um Comprimido
Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i>	15,00 mg
HPMC K4M	240,00 mg
Celulose MC 102	105,00 mg
Lactose Spray Dried	64,32 mg
Talco	18,00 mg
Ácido Cítrico	23,34 mg
Bicarbonato de Sódio	23,34 mg
Sulfato de Bário	93,00 mg
Dióxido de Silício Coloidal	6,00 mg
Estearato de Magnésio	12,00 mg

5.2. Análises Físico-químicas dos Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um Parasiticida

5.2.1. Aspecto dos Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um Parasiticida

Os comprimidos produzidos foram examinados visualmente, no que diz respeito ao exame de superfície para detectar irregularidades ou da coloração.

5.2.2. Dureza dos Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um Parasiticida

Determinou-se a dureza de 10 comprimidos conforme preconiza a Farmacopeia Portuguesa Edição 9.0 2009, utilizando Durômetro automático da marca Erweka.

5.2.3. Friabilidade dos Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um Parasiticida

Este parâmetro foi avaliado utilizando-se equipamento friabilômetro automático da marca Nova Ética, de acordo com metodologia da Farmacopeia Portuguesa Edição 9.0 2009.

5.2.3.1. Descrição do Método

O método consistiu em pesar com exatidão um mínimo de vinte comprimidos, introduzi-los no aparelho e submetê-los à ação do aparelho e retirá-los depois de efetuadas cem rotações num período de cinco minutos.

Após removeu-se qualquer resíduo de poeira dos comprimidos, eles foram novamente pesados. A diferença entre o peso inicial e o final dos comprimidos representa a friabilidade em função da porcentagem de pó perdido.

5.2.4. Determinação da Uniformidade de Massa das Preparações Apresentadas em Formas Farmacêuticas Unitárias

Para este ensaio foi aplicada metodologia preconizada na Farmacopeia Portuguesa Edição 9.0 2009, utilizando balança analítica da marca Ohaus.

5.2.4.1. Descrição do Método

O ensaio consistiu em pesar individualmente 20 unidades dos comprimidos, retiradas ao acaso da mesma formulação e determinada a massa média.

5.2.5. Diâmetro e Espessura dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida

Para determinação do diâmetro dos comprimidos foi aplicada metodologia preconizada por Prista, 2008 adaptada.

5.2.5.1. Descrição do Método

Utilizando um paquímetro calibrado dotado de visor digital para leitura mediu-se o diâmetro e a espessura dos comprimidos (centro e bordas).

5.2.6. Umidade do Pó dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida

Para este ensaio foi utilizado equipamento de infravermelho da marca Sartorius modelo MA30.

5.2.7. Ensaio de Dissolução/Perfil de liberação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida

No ensaio de dissolução dos comprimidos flutuantes, foi aplicado o método analítico de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os testes foram realizados em aparelho dissolutor automático da marca Erweka com seis cubas, usando as seguintes condições experimentais:

Volume: 500 mL

Velocidade: 100 rpm

Temperatura: 37 °C +/- 0,5

Haste: Pá

Líquido: HCl 0,1 N pH = 1,2

Foi introduzido um comprimido em cada cuba (Seis comprimidos para cada formulação). Foi coletada amostra a cada 1 hora por 8 horas, transferiu-se para vials após filtração com filtro de 0,45 µm e injetou-se em HPLC para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona.

5.2.7.1. Preparo do Padrão

Pesou-se 18,7 mg e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL. Completou o volume com HCL 0,1 N pH 1,2 e agitou. Retirou 1mL e transferiu para balão volumétrico de 5 mL. Completou o volume com HCl 0,1 N pH 1,2 e agitou. Transferiu para vials após filtração com filtro de 0,45 µm e injetou-se em HPLC.

5.2.7.2. Condições Cromatográficas

Equipamento: HPLC Merck Elite Modelo L 2200

Temperatura da coluna: 25 °C

Detector: 320 nm

Volume de injeção: 99 µL

Coluna: C18 Varian 150 x 4,6 mm

Fluxo: 1 mL/min.

O fluxo da fase móvel foi em gradiente de acordo com as condições especificadas abaixo:

Canal A: Solução diluente

Água purificada 69 mL

Ácido fórmico 1 mL

Metanol 30 mL

Canal B: Metanol

Tabela 15 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de dissolução para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Tempo (min.)	Canal A (%)	Canal B (%)
0	100	0
6	75	25
20	60	40

A partir dos resultados, foram obtidos os perfis de dissolução das quatro formulações. Os resultados obtidos no ensaio de dissolução foram aplicados nos diferentes modelos matemáticos para determinação da cinética de dissolução (**tabela 16**) e calculou-se os seguintes parâmetros de dissolução: $T_{50\%}$ (tempo necessário para que se liberte 50% ativo/marcador óxido de piperitenona) e eficácia de dissolução após oito horas (ED_{480}).

Tabela 16 - Ordem/modelos de cinética de dissolução usados na avaliação do perfil de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Ordem/Modelo	Equação*
Zero Ordem	$Q_t = Q_0 - K_0 t$
Primeira Ordem	$1nQ_t = 1nQ_0 - K_1 t$
Higuchi	$Q_t = K_H t^{1/2}$
Hixson-Crowell	$Q_t^{1/3} = Q_0^{1/3} - K_c t$

* Q_t - quantidade de fármaco liberado no tempo t ; Q_0 - quantidade inicial de fármaco em solução; K^0 , K^1 , K^H , K^C , - constantes de liberação de zero ordem, de primeira ordem, de Higuchi e de Hixson-Crowell, respectivamente; t - tempo.

A eficiência de dissolução ($ED\%$) foi calculada a partir dos valores obtidos da área sob a curva (ASC) do perfil de dissolução do ativo/marcador óxido de piperitenona, no intervalo de tempo (t), através do método de trapezóides. A eficiência de dissolução ($ED\%$) foi determinada através da razão entre a ASC de 0 a 480 min ($ASC_{0-480 \text{ minutos}}$) e a área total do retângulo (ASC_{TR}) definido pelo máximo da quantidade (%) dissolvida na ordenada e pela abscissa ($t = 480$ minutos). A ED foi expressa em percentagem da área do retângulo que descreve 100% de dissolução (Mahle *et al.*, 2007; Khan, 1975 e Bortoluzi & Laporta 2008), conforme equação a seguir.

$$ED = \frac{ASC_{(0-480)}}{ASC_{TR}} \times 100$$

5.2.8. Teste de Flutualidade *in vitro* dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida

Em aparelho dissolutor da marca Erweka com 500 mL de fluido gástrico sem pepsina, pH 1,2, aquecido à 37 °C +/- 0,5 e 100 rpm. Adicionou-se 1 comprimido em cada cuba. Observou-se o comportamento (Baumgartner, 2000).

5.2.9. Erosão dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida

Em recipiente contendo 1L de água purificada aquecida à 37° +/- 0,5 °C e submetidos a uma agitação de 50 rpm. Ao final de 8 horas, o restante de cada comprimido foi secado em estufa da marca FANEM aquecida à 40 °C até peso constante e a sua massa determinada (Coelho, 2007).

5.2.10. Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona nos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasitocida

Para a quantificação do marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes contendo óleo essencial de *Mentha crisper*, foi desenvolvida e validada (apêndice I) metodologia de análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para tanto foi utilizado HPLC da marca Merck modelo Elite Modelo L 2200, automático, com detector de UV e aquecedor de coluna.

5.2.10.1. Preparo da Amostra

Pesou-se 10 comprimidos e colocou-se em gral de porcelana. Em seguida triturou-se até obter um pó. Após pesou-se 1472 mg do pó e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol e agitou-se. Coletou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL e completou-se o volume com metanol, agitou-se. Filtrou-se com filtro 0,45 µm e injetou-se no HPLC.

5.2.10.2. Preparo do Padrão

Pesou-se cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferiu-se para balão volumétrico de 10 mL, completou-se o volume com metanol e homogeneizou-se. Coletou-se 1 mL e transferiu-se para balão volumétrico de 5 mL, completou-se o volume com

metanol, homogeneizou-se e filtra-se com filtro de 0,45 µm. Injetou-se três vezes em HPLC. As condições cromatográficas encontram-se abaixo.

Condições Cromatográficas

Equipamento: HPLC Merck Elite Modelo L 2200

Temperatura da coluna: 25 °C

Detector: 320 nm

Volume de injeção: 10 µL

Coluna: C18 Phenomenex 150 x 4,6 mm

C18 Varian 150 x 4,6 mm

Fluxo: 1 mL/min.

O fluxo da fase móvel é em gradiente de acordo com as condições especificadas abaixo:

Canal A: Solução diluente

Água purificada 69 mL

Ácido fórmico 1 mL

Metanol 30 mL

Canal B: Metanol

Tabela 17 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de teor do ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Tempo (min.)	Canal A (%)	Canal B (%)
0	100	0
6	75	25
20	60	40

5.3. Análise Microbiológica dos Comprimidos Flutuantes Contendo um Parasiticida

Foi aplicada metodologia para ensaios microbiológicos para produtos não estéreis, conforme definido na Farmacopeia Brasileira 5ª Edição, 2010. Também foi efetuada a pesquisa de coliformes totais e fecais de acordo com o Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos 1997 e Manual Prático de Análise de Água, 2006.

5.4. Resultados e Discussão

5.4.1. Análises do Pó e dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

Os comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida foram produzidos e armazenados a temperatura ambiente por seis meses. As avaliações foram efetuadas após a produção dos comprimidos. Todos os testes foram realizados após seis meses, com objetivo de avaliar a estabilidade dos comprimidos.

5.4.2. Testes dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

Foram realizadas análises físico-químicas dos comprimidos flutuantes no tempo inicial de fabricação e após seis meses, os resultados encontra-se nos ítems seguintes.

Os comprimidos flutuantes apresentaram um bom estado, cor homogênea e liso (**Figura 36**).



Figura 36 - Comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Foi observado que após seis meses os comprimidos permaneceram com as mesmas características físicas, aspecto e cor inalterados.

5.4.2.1. Dureza dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

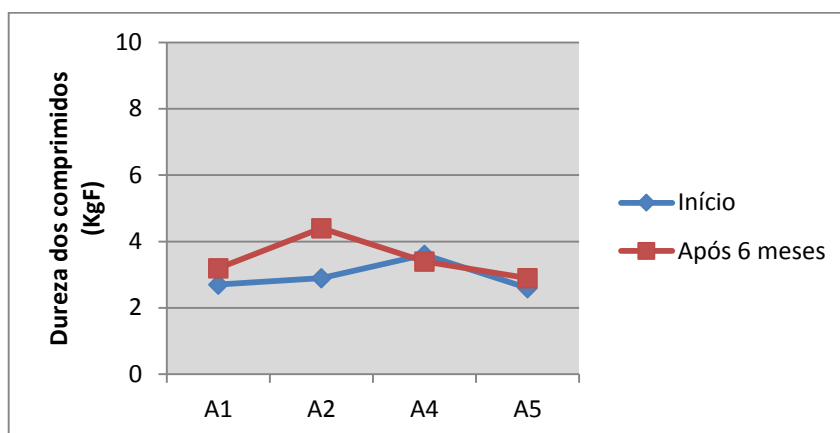


Figura 37 - Dureza dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Verifica-se que na análise inicial da dureza dos comprimidos, as formulações A1, A2 e A5 apresentaram resultado da análise de dureza abaixo do que especifica a Farmacopeia Portuguesa 2009 ($> 3 \text{ kgF}$). Enquanto que a formulação A4 apresentou resultado dentro do limite especificado ($3,6 \text{ kgF}$). Isto pode ter ocorrido pelo fato da formulação A4 apresentar o agente aglutinante, lactose spray-dried que favorece a compressibilidade (Figura 37).

5.4.2.2. Friabilidade dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

No que se refere à friabilidade dos comprimidos todas as formulações apresentaram resultados satisfatórios ($< 1 \%$), contudo a formulação A4 apresentou o melhor resultado ($0,227 \%$) (Figura 38).

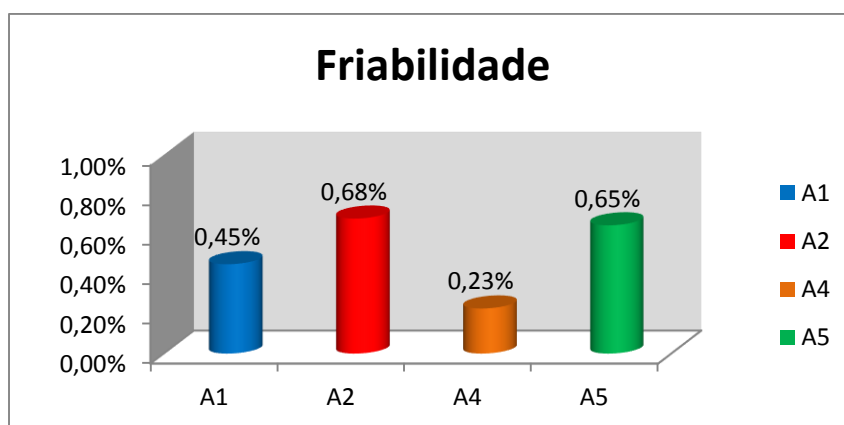


Figura 38 - Friabilidade dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Analisando os resultados apresentados anteriormente verifica-se que a friabilidade dos comprimidos flutuantes é inferior ao limite imposto pela Farmacopeia Portuguesa 2009. Porém, a formulação A4 apresentou melhor resultado possivelmente pela ação aglutinante da lactose spray dried presente exclusivamente nesta fórmula.

5.4.2.3. Determinação da Uniformidade de Massa das Preparações Apresentadas em Formas Farmacêuticas Unitárias

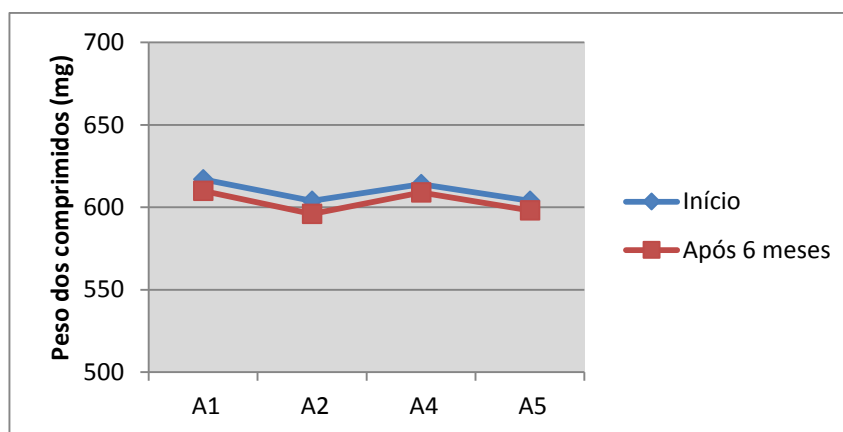


Figura 39 - Massa dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida.

A avaliação da massa dos comprimidos flutuantes demonstrou que nenhuma das formulações ultrapassou os limites exigidos pela Farmacopeia Portuguesa 2009, apresentando valores homogêneos e satisfatórios (**Figura 39**).

5.4.2.4. Diâmetro dos Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um Parasiticida

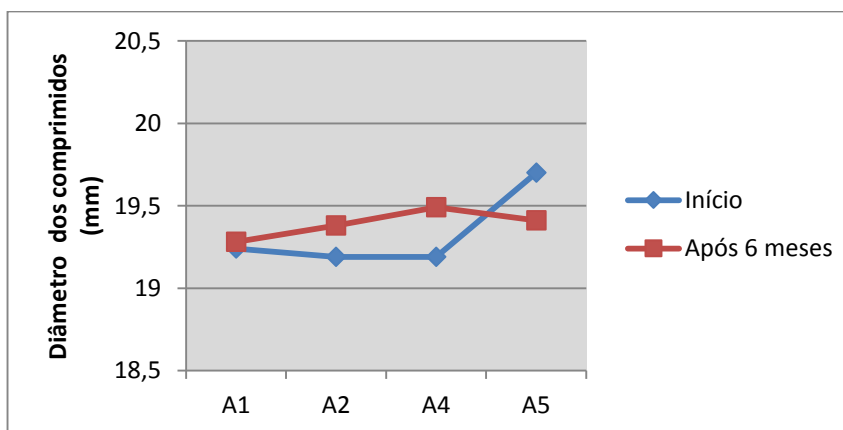


Figura 40 - Diâmetro dos Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um parasiticida.

Verifica-se que o diâmetro dos comprimidos das formulações estudadas apresentaram resultados uniformes (**Figura 40**).

5.4.2.5. Espessura dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

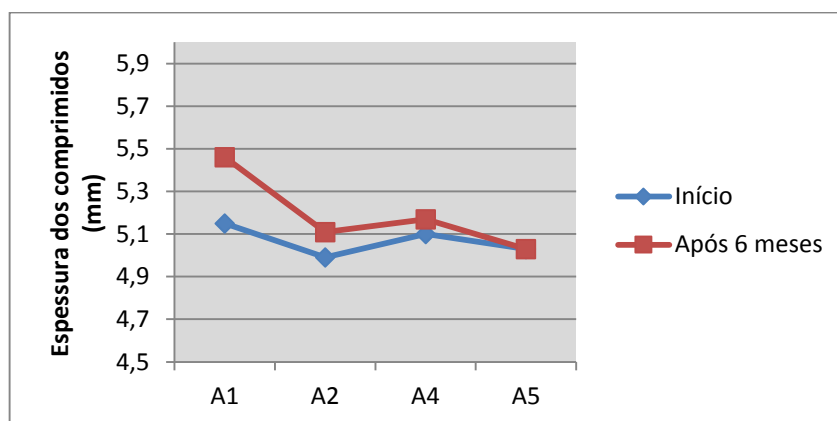


Figura 41 - Espessura dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida.

Verifica-se que a espessura dos comprimidos das formulações estudadas apresentaram resultados semelhantes (**Figura 41**).

5.4.2.6. Umidade do Pó dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

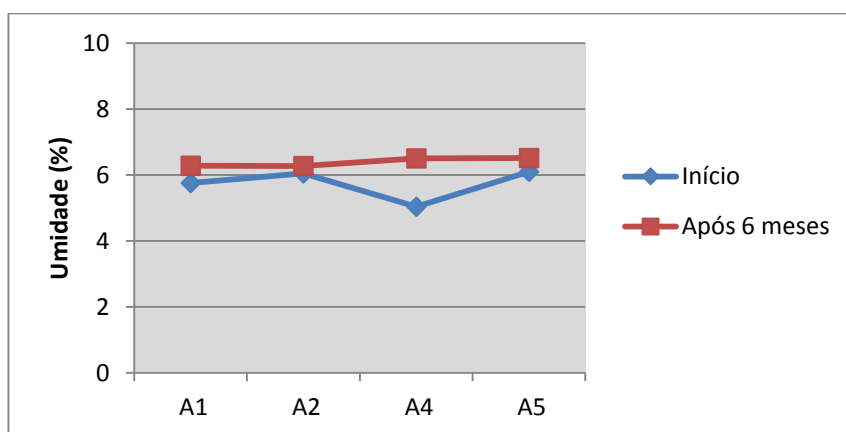


Figura 42 - Umidade do pó dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Da análise dos resultados apresentados na **figura 42** verifica-se que a umidade do pó dos comprimidos de todos os pilotos produzidos, obedece ao limite definido por PRISTA, 2008 que estabelece um valor < 8%. É importante salientar que após seis meses de

armazenamento os comprimidos não apresentaram aumento significativo da umidade. Este fato é bom, pois a umidade fora da especificação poderá provocar alterações significativas no que se refere à estabilidade dos comprimidos, podendo ocasionar alterações químicas do ativo/marcador e mudança na cor dos comprimidos.

5.4.2.7. Ensaio de Dissolução/Perfil de Liberação dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

Tabela 18 - Resultado do teste de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida nas quatro formulações (A1, A2, A4 e A5).

Hora	Formulações			
	A1 (%)	A2 (%)	A4 (%)	A5 (%)
1	26,22	24,52	27,02	25,55
2	44,05	40,00	31,00	41,11
3	62,11	53,75	54,2	53,33
4	67,62	61,77	61,77	58,28
5	76,72	67,92	70,93	65,88
6	85,55	72,34	77,37	71,27
7	93,60	77,26	81,64	78,00
8	99,28	81,04	82,31	80,28

Verifica-se na **tabela 18** que o percentual de liberação do ativo/marcador óxido de piperitenona na primeira hora está de acordo com a especificação da Farmacopeia Portuguesa edição 2009 para medicamentos de liberação prolongada, onde no primeiro ponto obtém-se em regra, uma taxa de dissolução de 20 a 30 % e o último ponto mais de 80%. Este fato ocorreu em todas as quatro formulações.

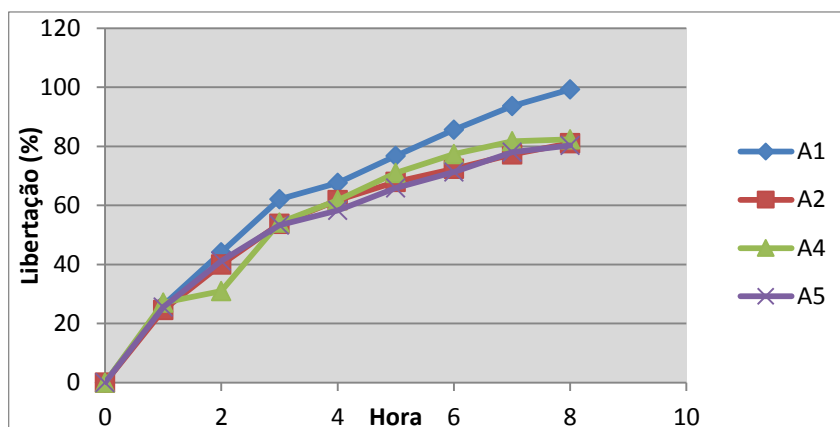


Figura 43 - Perfil de dissolução dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida nas quatro formulações (A1, A2, A4 e A5).

Da análise do gráfico verifica-se que as formulações desenvolvidas apresentam boas características para modular a libertação do ativo/marcador óxido de piperitenona durante o período de 8 horas. Observa-se também que as quatro formulações apresentaram perfil de dissolução semelhante, contudo a formulação A1 na oitava hora liberou quase 100% do ativo/marcador óxido de piperitenona (**Figura 43**).

Tabela 19 - Coeficiente de correlação linear (r) obtido através de linearização do perfil de dissolução dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida.

Formulação	Ordem Zero	Primeira ordem	Higuchi	Hixson-Crowell
A1	0,937	0,827	0,990	0,965
A2	0,899	0,991	0,991	0,970
A4	0,912	0,983	0,974	0,970
A5	0,904	0,991	0,995	0,974

Através da linearização do perfil de dissolução dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida foi possível calcular o coeficiente de correlação, r , de cada formulação nos diferentes modelos (ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Hixson-Crowell). De acordo com os resultados apresentados na **tabela 19**, todas as quatro formulações apresentaram uma cinética de libertação que se aproxima mais dos modelos Higuchi e de primeira ordem, sendo que a formulação A1 a que mais se afastou deste modelo.

Tabela 20 - Parâmetros de dissolução dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida nas quatro formulações (A1, A2, A4 e A5).

Formulação	QT ₄₈₀	ED ₄₈₀	T ₅₀
A1	99,28 %	62,172 %	153 min
A2	81,04 %	65,618 %	168 min
A4	82,31 %	66,687 %	168 min
A5	80,28 %	65,561 %	168 min

Os resultados obtidos da eficiência de dissolução (ED%) dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida demonstraram valores próximos (**Tabela 20**). A eficiência de dissolução é um importante parâmetro de cinética de dissolução, pois está relacionado com a quantidade real de ativo que se encontra dissolvida no meio e, desta forma, pode-se ter um melhor prognóstico dos resultados *in vivo*, por isto, o uso da eficiência de dissolução é defendida por alguns autores, em virtude de que a biodisponibilidade é estimada por integração da área sob a curva de concentrações plasmáticas e os resultados de dissolução *in vitro* são expressos através da área sob a curva de concentrações dissolvidas do fármaco (Serra & Storpidis, 2007).

5.4.2.8. Flutualidade *in vitro* dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

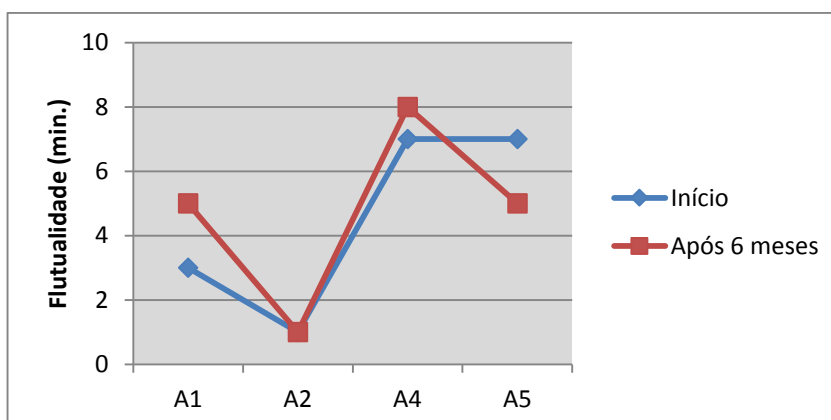


Figura 44 - Flutualidade *in vitro* dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Neste ensaio verificou-se que os comprimidos das quatro formulações produzidas, flutuaram em menos de 10 minutos e que a formulação A2 demonstrou melhor resultado (**Figura 44 e 45**).

Estes resultados é concordante com os obtidos na literatura e justificado pelo intumescimento da matriz hidrofílica e presença de agentes formadores de gás. Verificou-se também que os comprimidos de todas as formulações começaram a flutuar com menos de 1 minuto de ensaio. Os comprimidos de todas as formulações flutuaram por mais de 24 horas.

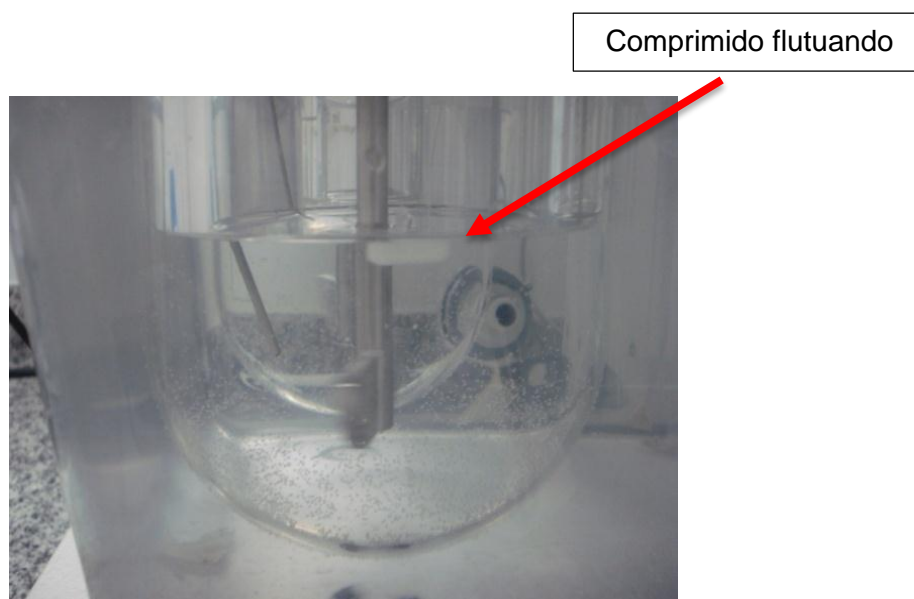


Figura 45 - Comprimidos de liberação modificada contendo um parasiticida flutuando em meio ácido (HCL 0,1N pH 1,2).

5.4.2.9. Erosão dos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

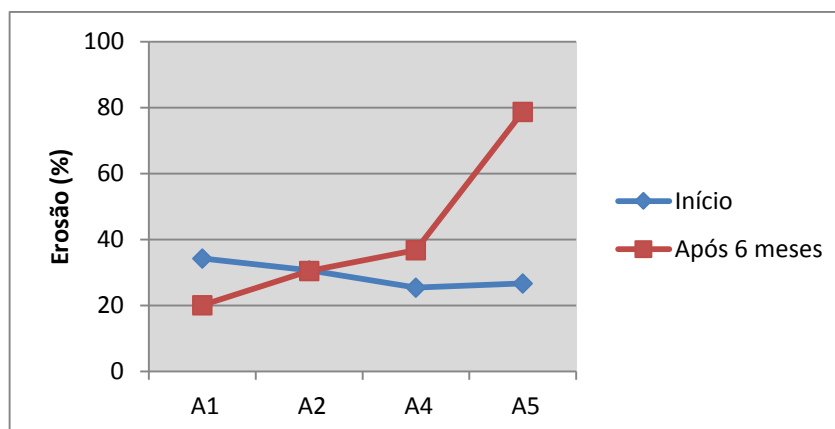


Figura 46 - Erosão dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Verifica-se que todas as formulações apresentaram resultados semelhantes aos encontrados na literatura, provavelmente pelo uso de matriz hidrofílica de baixa densidade, o HPMC K4M (**Figura 46 e 47**).

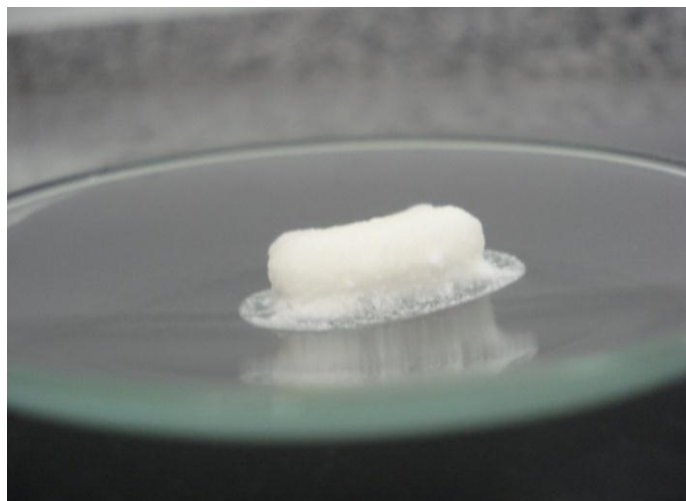


Figura 47 - Comprimido flutuante de liberação modificada contendo um parasiticida após ensaio de erosão.

5.4.2.10. Teor do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona nos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

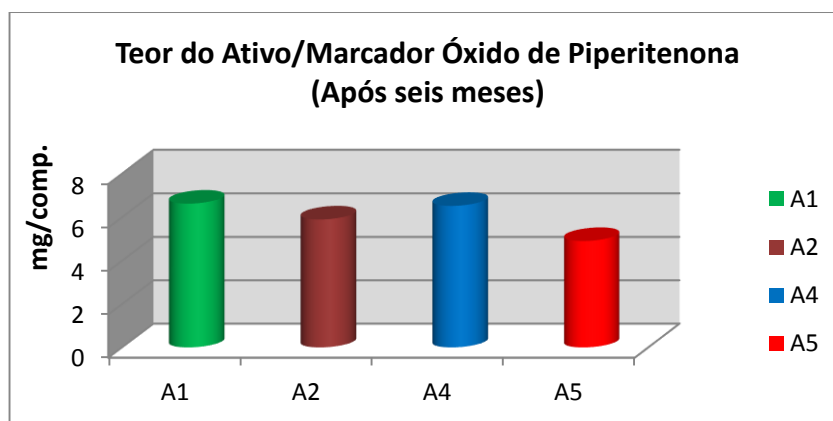


Figura 48 - Teor do ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Da análise dos resultados apresentados na **figura 48** verifica-se que a formulação A5 apresentou resultado baixo quando comparado às outras formulações.

5.4.2.11. Ensaio Microbiológico

O estudo microbiológico dos comprimidos flutuantes apresentou resultados satisfatórios de acordo com o que estabelece a Farmacopeia Brasileira, 5ª Edição 2010, para produtos não estéreis (**Tabela 21 e 22**).

Tabela 21 - Resultado do ensaio de contagem de microrganismos viáveis em produtos não estéreis realizado nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Formulação	Contagem de Microrganismos Viáveis em Produtos não Estéreis
A1	< 1 UFC/comprimido
A2	< 1 UFC/comprimido
A4	< 1 UFC/comprimido
A5	< 1 UFC/comprimido

Tabela 22 - Resultado do ensaio de pesquisa de microrganismos patógenos realizado nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Microrganismo	Formulação			
	A1	A2	A4	A5
<i>Salmonella sp</i>	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.
<i>S. aureus</i>	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.
<i>P. aeruginosa</i>	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.
<i>E. coli</i>	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.	< 1 UFC/comp.

Os comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida conforme tabela a seguir apresentaram resultados satisfatórios no ensaio de pesquisa de coliformes totais e fecais (**Tabela 23**).

Tabela 23 - Resultado do ensaio de pesquisa de coliformes fecais e totais realizado nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida.

Formulação	Pesquisa de Coliformes Fecais e Totais
A1	< 1 UFC/comprimido
A2	< 1 UFC/comprimido
A4	< 1 UFC/comprimido
A5	< 1 UFC/comprimido

5.5. Conclusão

O método desenvolvido para determinar o teor do ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida, atende aos requisitos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade, intervalo e robustez de acordo com a USP 34, 2011. Dessa forma, podemos afirmar que este método é seguro e eficaz;

Após seis meses de produzido os comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida não apresentaram alteração significativa quanto às características físico-químicas. No que se referem às características microbiológicas os comprimidos apresentaram resultados satisfatórios, comprovando a qualidade dos comprimidos produzidos;

A modulação da liberação do ativo/marcador óxido de piperitenona pode ser feita de forma eficaz recorrendo à matriz hidrofílica de baixa viscosidade. Este fato é sobremodo importante, considerando que a liberação imediata ativo/marcador óxido de piperitenona poderia provocar irritabilidade na mucosa intestinal;

Este tipo de sistema, matriz hidrofílica, recorre a polímeros bem conhecidos e descritos, além de não exigir maquinaria altamente especializada para sua produção;

O uso de uma matriz hidrofílica associada à agente formador de gás (bicarbonato de sódio e ácido cítrico) foi aplicada com sucesso para obter flutualidade dos comprimidos produzidos a partir de derivado vegetal.

Capítulo VI

Ensaio Pré-clínicos

6.1. Análise de Flutuação dos Comprimidos *in vivo*

O comportamento *in vivo* dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida, foi caracterizado através de testes radiográficos em cão macho da raça beagle, pesando cerca de 16 kg. As radiografias foram tiradas no ângulo dorsoventral, em tempos de 0,5; 1; 2; 4; 8 e 12 h. O animal foi mantido em jejum por 24 horas. O cão engoliu o comprimido e imediatamente após tomou 100 mL de água. Durante todo o experimento o animal não se alimentou. O experimento foi realizado no Centro Médico Veterinário na cidade de João Pessoa - Paraíba - Brasil.

6.2. Toxicidade Aguda e Determinação da DL₅₀

Para determinação da DL₅₀ do óleo essencial da *Mentha crispa* foram utilizados grupos de camundongos de ambos os sexos (25-30g; n=10 animais/grupo) acomodados em gaiolas individuais durante 24 horas. Depois disso, os grupos experimentais foram tratados por gavagem (com jejum prévio de 12 horas) nas concentrações (X, Y, Z, W, S, T) e veículo (Controle) (**Figura 49**). Os grupos foram atentamente observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 minutos e depois a cada 24 horas durante 14 dias (**Figura 50**). As observações incluíram avaliação dos olhos, salivação, tremores, convulsões, atividade motora, resposta a estímulos sensoriais, bem como outros sinais clínicos de toxicidade (Malone, 1977) ou morte. No final do ensaio, os animais sobreviventes foram sacrificados e realizados o exame macroscópico das seguintes vísceras: coração, pulmões, rins, fígado, estômago, ovários, úteros e testículos. A percentagem de mortalidade foi observada por 72 horas e a DL₅₀, calculada de acordo com o método dos probitos (Miller & Tainter, 1944).



Figura 49 - Administração oral da amostra de óleo essencial da *Mentha crispa* e animal roedor, pelo método de gavagem.



Figura 50 - Avaliação dos camundongos Swiss, em campo aberto, após administração do óleo essencial da *Mentha crisper* em diferentes concentrações.

6.3. Toxicidade Sub-Crônica

Foram utilizados ratos Wistar de ambos os sexos (200-250 g) separados aleatoriamente em 03 grupos (n=10 animais/grupo). Os animais foram tratados de acordo com as doses (média e baixa), determinadas em função da DL₅₀, enquanto o terceiro grupo (controle) recebeu o veículo durante um período de 35 dias consecutivos. Os animais foram diariamente observados para registro de possíveis alterações fisiológicas e/ou comportamentais e morte. A evolução do peso corpóreo (g) de todos os animais foi determinada antes do início do tratamento e semanalmente até o final do mesmo. No final do experimento, amostras de sangue de todos os animais, submetidos a jejum de 12h, foram obtidas através do plexo retro-orbital com auxílio de capilar de vidro, transferidas para tubos com gel separador para soro e centrifugadas a 7000 rpm, para análise de variáveis hematológicas (hemograma completo) e bioquímicas. Finalizada a coleta de sangue, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e as vísceras (fígado, coração, rins, esôfago, estômago, intestinos, órgãos sexuais, pâncreas, adrenais, tireóide e pulmões) foram removidas, pesadas e examinadas macroscopicamente.

6.3.1. Determinação dos Parâmetros Hematológicos

Os parâmetros hematológicos (eritrócitos, leucócitos, plaquetas, hemoglobina, hematócrito e os índices hematimétricos: volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados imediatamente após a coleta através do analisador automático de células hematológicas Coulter STKS. A contagem diferencial de leucócitos (neutrófilo, eosinófilo, basófilo, linfócitos e monócitos) foi realizada em extensões coradas com May-Grünwald-Giemsa.

6.3.2. Determinação dos Parâmetros Bioquímicos

Foram realizadas análises dos seguintes parâmetros bioquímicos:

- TGO,
- TGP,
- Fosfatase Alcalina,
- Colesterol Total,
- Colesterol HDL,
- Colesterol LDL
- Ureia,
- Creatinina,
- Colesterol VLDL,
- Triglicérides,
- Glicose,
- Proteínas e
- Bilirrubina Total.

Estes parâmetros foram determinados com o auxílio do analisador automático ARCHITECT® com sistemas comerciais da Abbot.

6.4. Resultados e Discussão

6.4.1. Testes *in vivo*

6.4.1.1. Estudos Radiográficos

De acordo com as figuras a seguir, observa-se que o comprimido flutuante de liberação modificada contendo um parasiticida saiu do estômago após 8 horas. Comparando-se o resultado encontrado com os obtidos em comprimidos de pentoxifilina onde foi aplicado o mesmo sistema de flutualidade (HPMC K4M com ácido cítrico e bicarbonato de sódio), com tempo de retenção gástrica de 4 horas (Baumgartner, 2000), estes resultados são animadores. Considerando também, que a comparação da motilidade gástrica e esvaziamento do estômago entre os seres humanos e cães não mostra grandes diferenças verifica-se que experimentalmente, em cão beagle o comprimido flutuante de liberação modificada contendo um parasiticida aumentou o tempo de retenção gástrica quando comparado em seres humanos que é menor que 2 horas. Este resultado é encorajador, pois um tempo de residência gástrico mais longo é uma condição importante

para a maior biodisponibilidade das drogas incluídas nas formas de dosagem de liberação prolongada ou controlada.

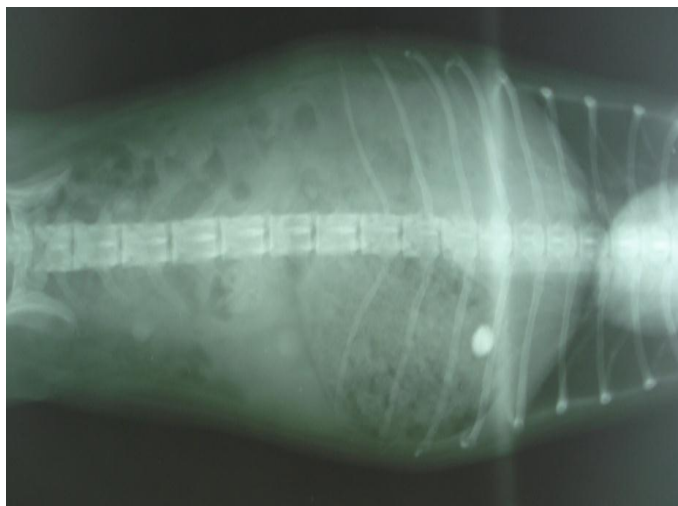


Figura 51 - Comprimido flutuante de liberação modificada no estômago de cão beagle após 0,5 h da administração.

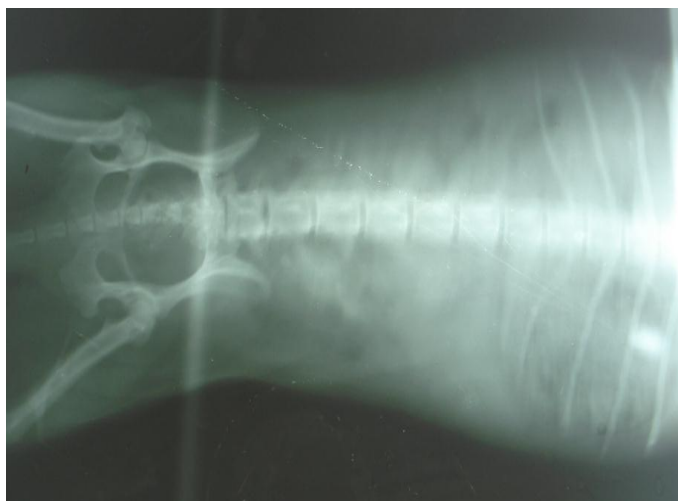


Figura 52 - Comprimido flutuante de liberação modificada no estômago de cão beagle após 1 h da administração.



Figura 53 - Comprimido flutuante de liberação modificada no estômago de cão beagle após 2h da administração.

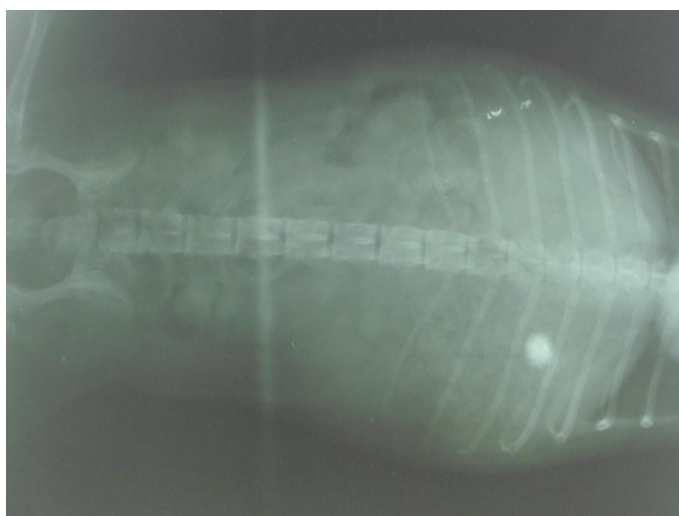


Figura 54 - Comprimido flutuante de liberação modificada no estômago de cão beagle após 4h da administração.

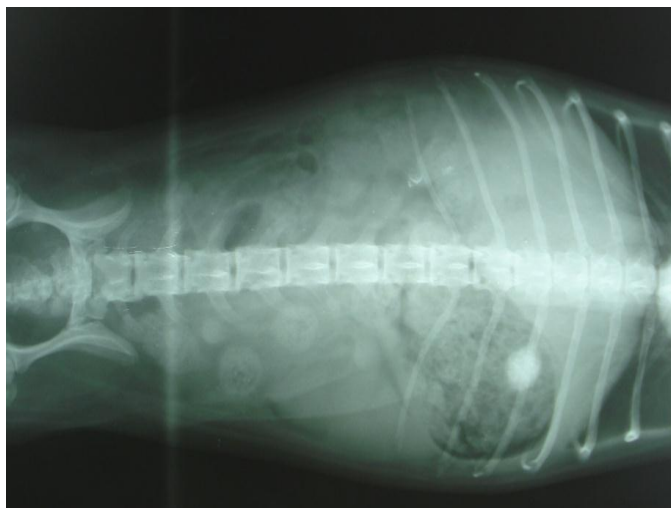


Figura 55 - Comprimido flutuante de liberação modificada no estômago de cão beagle após 8h da administração.

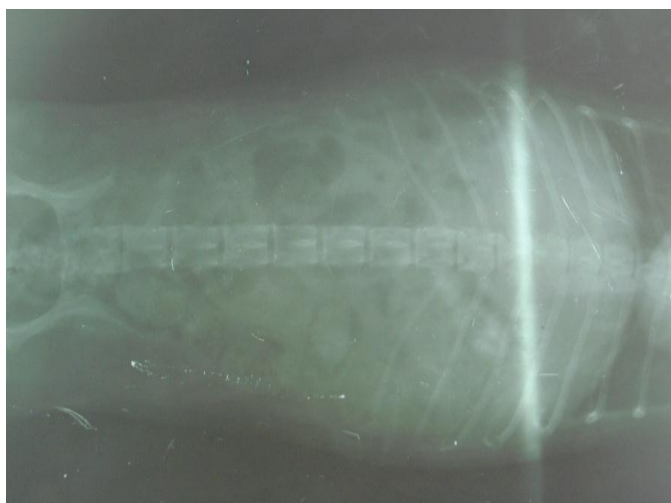


Figura 56 - Comprimido flutuante de liberação modificada no estômago de cão beagle após 12h da administração.

6.4.1.2. Toxicidade Aguda e Determinação da DL_{50}

Após a administração do óleo essencial de *Mentha crispa*, foi observado o efeito irritante através do comportamento dos animais de coçar e arrastar o focinho. Dez minutos após a administração 100% dos animais tratados com o óleo essencial da *Mentha crispa*, nas doses de 2,5 ou 1,5 mL/kg apresentaram excitação, reação de fuga e sialorreia. Entre 20 e 180 minutos foram observados: dispneia, perda da coordenação motora do trem posterior com aparecimento de tremores, ptose palpebral, convulsões e ataxia. Após esta fase excitatória, todos os animais dos grupos tratados com óleo essencial da *Mentha crispa* (2,5 ou 1,5 mL/kg; v.o.) apresentaram palidez nas extremidades, contorção

abdominal, arqueamento da coluna, depressão, micção e morte com a musculatura espástica. Em 70% dos animais tratados com óleo essencial de *Mentha crispa* (1,0 mL/kg) apresentaram sintomas semelhantes aos do grupo anterior chegando a óbito. Os outros 30% apresentaram sintomas mais leves e reverteram o quadro ficando vivos até o 14º dia.

Na dose de 0,75 mL/kg, após três horas, 20% dos animais apresentaram sialorreia e ptose palpebral e 60% apresentaram reação de fuga. Na dose de 0,50 mL/kg, após uma hora, 40% dos animais apresentaram ptose palpebral e 20% apresentou reação de fuga. Na dose de 0,25 mL/kg um único animal apresentou comportamento de coçar o focinho e reação de fuga. Entretanto não ocorreu mortalidade, nos grupos 0,75; 0,50 e 0,25 mL/kg. A dose letal (DL_{50%}) calculada pelo método dos probitos foi de 0,80 mL/kg (**Tabela 24**). Na avaliação macroscópica dos órgãos os animais tratados com o óleo essencial da *Mentha crispa* não diferiram do controle.

6.4.1.3. Avaliação do Peso Corpóreo e dos Órgãos

A avaliação do desempenho do peso corpóreo demonstrou que não ocorreu diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados com o óleo essencial da *Mentha crispa* (50 ou 100 µL/kg) e grupo controle (**Figura 57 e 58**). No que concerne o peso dos órgãos (g/100g), os ratos machos apresentaram um aumento da massa cardíaca ($1,48 \pm 0,08$ g) do grupo tratado com o óleo essencial da *Mentha crispa* (100 µL/kg) quando comparado ao controle ($1,4 \pm 0,10$ g) conforme **tabela 25**. O peso dos demais órgãos avaliados dos machos e das fêmeas, nas doses testadas, comparado ao grupo controle não diferiram estatisticamente (**Tabela 26**).

Tabela 24 - Percentual de mortos no teste de avaliação da toxicidade aguda do óleo essencial de *Mentha crispa* em camundongos Swiss (n=10/grupo).

Óleo Essencial da <i>Mentha crispa</i> Diluído em Óleo de Milho							Controle - Óleo de Milho (<i>Zea mays</i>)
Dose (mL/kg em 0,30mL, v.o.)	2,5	1,5	1,0	0,75	0,50	0,25	(0,3 mL/animal)
Nº Animais	10 (5M + 5F)						
Nº de Mortos/ Total de Animais	10/10	10/10	7/10	0/10	0/10	0/10	0/10
% Mortos	100%	100%	70%	0%	0%	0%	0%

Tabela 25 - Valores médios dos órgãos dos ratos da linhagem Wistar machos (g/100g) submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da *Mentha crisper* L. e grupo controle (Óleo de milho (*Zea mays*) (n=5/grupo)).

Órgãos	Controle (0,3mL/animal)	Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i> L.	
		50 µL/kg	100 µL/kg
Fígado	4,05 ± 0,42	3,60 ± 0,60	3,97 ± 0,54
Rins	0,85 ± 0,03	0,84 ± 0,06	0,90 ± 0,04
Coração	0,38 ± 0,03	0,37 ± 0,02	0,43 ± 0,03*
Baço	0,22 ± 0,02	0,21 ± 0,03	0,23 ± 0,04
Pulmão	0,58 ± 0,10	0,54 ± 0,05	0,65 ± 0,10
Estômago (cheio)	0,85 ± 0,15	1,02 ± 0,20	0,86 ± 0,12
Estômago (vazio)	0,57 ± 0,02	0,57 ± 0,08	0,59 ± 0,06
Testículos	1,57 ± 0,11	1,74 ± 0,18	1,64 ± 0,16

*Nas linhas, grupo tratamento x controle (entre o mesmo sexo) *p <0.05.

Tabela 26 - Valores médios dos órgãos dos ratos da linhagem Wistar fêmeas (g/100g) submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da *Mentha crisper* e grupo controle (Óleo de milho (*Zea mays*) (n=5/grupo)).

Órgãos	Controle (0,3 mL/animal)	Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i>	
		50 µL/kg	100 µL/kg
Fígado	3,04 ± 0,26	3,19 ± 0,40	3,26 ± 0,29
Rins	0,71 ± 0,02	0,70 ± 0,10	0,69 ± 0,11
Coração	0,45 ± 0,04	0,39 ± 0,04	0,43 ± 0,11
Baço	0,22 ± 0,04	0,25 ± 0,04	0,26 ± 0,07
Pulmão	0,69 ± 0,07	0,58 ± 0,09	0,63 ± 0,09
Estômago (cheio)	1,31 ± 0,82	1,13 ± 0,24	1,31 ± 0,29
Estômago (vazio)	0,60 ± 0,08	0,69 ± 0,04	0,71 ± 0,15
Útero	0,31 ± 0,08	0,34 ± 0,09	0,34 ± 0,06
Ovário	0,06 ± 0,02	0,08 ± 0,04	0,07 ± 0,05

* Nas linhas, grupo tratamento x controle (entre o mesmo sexo) *p < 0.05.

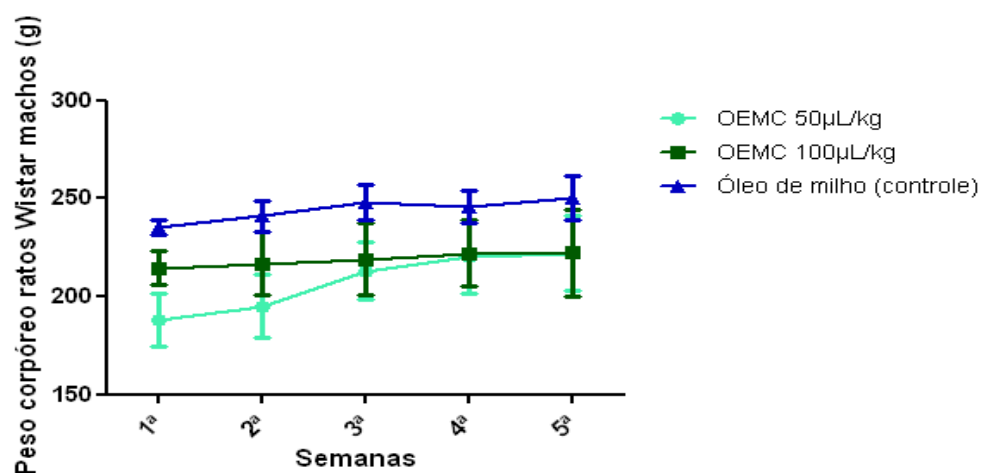


Figura 57 - Valores médios do peso corpóreo dos ratos Wistar machos submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da *Mentha crispera* (50 µL/kg e 100µL/kg; v.o.) e grupo controle (óleo de milho (*Zea mays*) (n=5/grupo)).

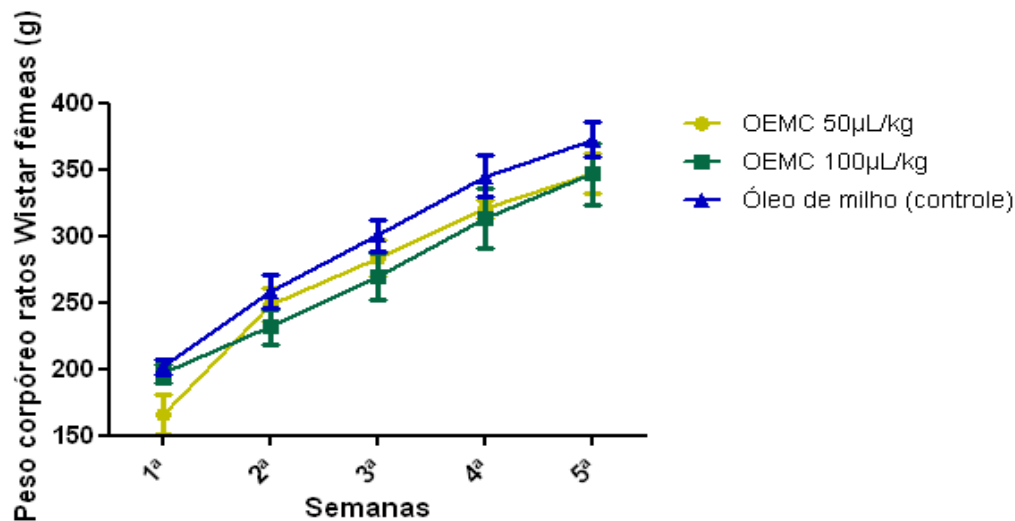


Figura 58 - Valores médios do peso corpóreo dos ratos Wistar fêmeas submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 35 dias, utilizando óleo essencial da *Mentha crispera* (50 µL/kg e 100 µL/kg; v.o.) e grupo controle (óleo de milho (*Zea mays*) (n=5/grupo)).

6.4.1.4. Avaliação Hematológica e Bioquímica

O óleo essencial da *Mentha crisper* nas doses (50 ou 100 µL/kg) não provocou alteração estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no perfil hematológico (**Tabela 27**). A contagem de eritrócitos foi normal e nenhuma alteração foi observada no hematócrito ou nos valores de hemoglobina. As plaquetas permaneceram inalteradas em número. Provavelmente o produto testado não causa danos diretos nas células sanguíneas, na medula óssea ou na absorção ou incorporação de nutrientes necessários para a eritropoiese, pelo menos, num grau suficiente para causar anemia. Similarmente, não houve efeitos significantes na contagem total ou diferencial das células sanguíneas da linhagem leucocitária.

Os níveis séricos de TGO ($75 \pm 9,97$ U/L) e FA ($184,4 \pm 32,08$ U/L) se elevaram respectivamente, em 25,83% e 60,34% nos animais tratados com óleo essencial da *Mentha crisper* (100 µL/kg), quando comparados com o controle. As concentrações séricas de LDL nos animais tratados com óleo essencial da *Mentha crisper*, 50 µL/kg ($61 \pm 8,60$ U/L) ou 100 µL/kg ($70,6 \pm 6,88$ U/L), apresentaram redução de 32,81% e 22,24% quando comparados com controle, respectivamente, conforme **tabela 28**.

Tabela 27 - Parâmetros hematológicos de ratos Wistar submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 30 dias, utilizando o óleo essencial da *Mentha crispera* nas doses de 50 µL/kg, 100 µL/kg e grupo controle (Óleo de milho (*Zea mays*) (0,3 mL/animal)).

Parâmetro/Unid.	Referência **	Óleo de Milho (<i>Zea mays</i>) Controle (0,3 mL/animal)		Óleo Essencial de <i>Mentha crispera</i> (50µL/kg; v.o.)			
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Hemácias	7,45 – 9,45 x10 ⁶ /mm ³	7,21±0,41	8,14 ±0,27	6,83±0,21	8,38 ±0,62	7,16±0,33	7,94 ±0,42
Hemoglobina (g/dL)	12,45 – 15,95g/%	15,00±0,54	16,24 ±0,60	14,02±0,30	17,38 ±1,47	14,72±0,51	16,22 ±0,49
Hematócrito (%)	40,8 – 50,3%	41,68±1,50	48,42 ±2,20	39,00±0,60	50,58 ±4,44	40,96±1,24	47,68 ±2,12
VCM (µm ³)	50,35 – 61,5 µm ³	57,20±1,64	59,34 ±0,96	57,00±1,78	60,28 ±1,49	57,20±1,47	60,02 ±1,47
HCM (pg)	14,8 – 18,5 pg	20,86±0,71	19,98 ±0,58	20,52±0,77	20,72 ±0,29	20,58±0,58	20,44 ±0,60
CHCM (g/dL)	26,35 – 35,75%	36,00±0,34	33,64 ±0,77	35,92±0,54	34,34 ±0,56	35,92±0,55	34,08 ±0,92
Plaquetas (mil/mm ³)	500 – 1300 x 10 ³ /mm ³	954,60±245,98	500,800±183602,96	781,60±80,34	696,20±244848,32	848,20±78,12	573,400 ±76077,59
Leucócitos (mil/mm ³)	7,3 -12,2 x 10 ³ /mm ³	11,60±2,18	11,600 ±2554,40	15,32±1,91	13,580 ±4278,08	12,78±1,73	12,140 ±2735,50
Neutrófilos (mil/mm ³)	5 – 45,5%	8,86±0,59	1248,2 ±891,56	5,76±0,93	1758,80 ±842,08	7,94±0,64	2456,2 ±1885,53
Eosinófilos (mil/mm ³)	0,09 – 1,3%	0,08±0,04	209,0 ±126,08	0,08±0,11	195,00 ±119,85	0,52±0,99	233,40 ±169,96
Basófilos (mil/mm ³)	0 – 1,5%	0,40±0,10	13,2 ±12,75	0,40±0,10	539,00 ± 1057,23	0,40±0,11	932,40 ±2010,16
Linfócitos TIP	53,5 – 83,5%	89,72±0,73	9077,2 ±2052,82	92,66±1,16	8357,8 ±4043,70	90,24±1,50	7666,4 ±3205,54
Monócitos (mil/mm ³)	0,0 – 1,23%	0,94±0,18	1048,4 ±1392,41	1,10±0,35	2127,20 ±1879,83	0,90±0,30	1680,00 ±1112,09

*Nas linhas, grupo tratamento x controle (entre o mesmo sexo) *p < 0.05 ** (Mitruka et al., 1977).

Tabela 28 - Parâmetros bioquímicos de ratos Wistar submetidos ao ensaio de toxicidade sub-crônica durante 30 dias, utilizando o óleo essencial da *Mentha crisper* nas doses de 50 µL/kg, 100 µL/kg e grupo controle (Óleo de milho (*Zea mays*) (0,3 mL/animal)).

Parâmetro/Unid.	Referência**	Óleo de Milho (<i>Zea mays</i>) Controle (0,3 mL/animal)				Óleo Essencial da <i>Mentha crisper</i>			
		Machos		Fêmeas		50µL/kg		100 µL/kg	
		Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas	Machos	Fêmeas
Fosfatase alcalina (U/L)	56,8 - 128	141,60±15,09	115,00±33,72	179,20±28,62	158,80±40,53 *	141,80±9,98	184,40±32,08		
TGO	45,7 - 80,8	86,20±8,84	97,00±10,46	91,20±4,26	115,20±9,47	101,00±15,55	108,20±10,01 *		
TGP	17,5 - 30,2	49,80±6,76	59,60±5,12	50,00±5,87	57,60±4,56	46,00±3,93	75,00±9,97		
Bilirrubina total (mg/dL)	0,20 - 0,55	0,102±0,01	0,084±0,02	0,108±0,01	0,062±0,01	0,112±0,01	0,08±0,01		
Uréia (mg/dL)	5 - 29	36,20±3,42	41,20±3,11	37,60±5,07	46,60±6,02	38,80±6,97	46,60±1,14		
Creatinina (mg/dL)	0,2 - 0,8	0,42±0,08	0,70±0,12	0,30±0,17	0,70±0	0,42±0,04	0,70±0,07		
Glicose (mg/dL)	50 - 135	126,80±3,11	123,80±14,72	121,30±11,37	124,60±10,80	120,80±4,96	118,20±9,88		
Proteínas totais (g/dL)	4,7 - 8,15	6,78±0,21	7,72±0,46	7,10±0,25	6,82±0,25	7,12±0,31	6,82±0,37		
Triglicerídeos (mg/dL)	26 - 145	83,20±9,75	46,20±11,03	59,40±24,73	50,60±17,09	71,20±8,78	43,20±7,12		
Colesterol LDL	-	45,60±10,11	90,80±14,95	54,20±4,54	61,00±8,60*	50,80±10,05	70,60±6,87*		
Colesterol HDL	-	24,40±2,70	30,00± 2,23	26,00±2,91	28,20±2,16	26,60±1,81	26,80±2,58		
Colesterol VLDL	-	16,60±2,07	9,00±2,23	11,80±4,96	10,20±3,42	14,20±1,78	8,60 ±1,51		
Colesterol Total	40 - 130	86,60±12,40	129,80±15,30	92,00±8,45	99,40±7,60	91,60±11,86	106,00±8,45		

*Nas linhas, grupo tratamento x controle (entre o mesmo sexo) *p < 0.05. ** (Mitraka et al., 1977).

6.5. Conclusão

Os dados apresentados anteriormente demonstram que o comprimido flutuante de libertação modificada contendo um parasiticida aumenta o tempo de permanência gástrica;

Os níveis séricos de TGO e fosfatase alcalina, nos animais tratados com o óleo essencial da *Mentha crispa*, apresentaram resultados aumentados. Esses resultados indicam que o óleo essencial da *Mentha crispa* na dose de 100 µL/kg poderá ocasionar possíveis alterações hepáticas, quando administrado de forma sub-crônica;

Nas doses de 50 e 100 µL/kg nos animais tratados com o óleo essencial da *Mentha crispa*, não houve alteração nos parâmetros hematológicos, quando administrado de forma sub-crônica;

Na dose de 50 e 100 µL/kg os animais tratados com o óleo essencial da *Mentha crispa* provocou diminuição do nível sérico de LDL, quando administrado de forma sub-crônica, este resultado é considerado bom pois a elevação do nível sérico de LDL é importante fator de risco para doenças cardíacas.

Capítulo VII

Conclusão

7.1. Conclusão

A fabricação de comprimidos matriciais a partir de polímeros hidrofílicos é uma das técnicas mais utilizadas para modular e sustentar a liberação de fármacos;

A simplicidade da sua produção, que apenas exige maquinaria convencional, aliada a sua grande versatilidade faz destes sistemas primeira escolha quando da formulação de formas farmacêuticas de liberação modificada;

A produção de comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo óleo essencial de planta pode ser aplicada através do uso do polímero HPMC de baixa viscosidade, associada a agente formador de gás, o ácido cítrico e bicarbonato de sódio;

Os estudos realizados tanto *in vitro* como *in vivo* demonstraram que os comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida, flutuam no sistema gastrointestinal;

A metodologia desenvolvida e validada por CLAE para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* e nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida é segura e confiável;

Comprimidos flutuantes e de liberação modificada contendo ativo de origem vegetal podem ser produzidos utilizando a técnica de compressão direta, sem uso de granulação. Isto é extremamente vantajoso, pois se elimina uma etapa de produção com consequente diminuição de custos e tempo;

Este novo produto desenvolvido para combater a protozoose amebíase na forma de comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo óleo essencial da *Mentha crisper*, permitiu a aplicação de uma posologia reduzida, quando comparado ao fitoterápico tradicional, passando de 2 comprimidos ao dia por três dias, para um comprimido dose única, proporcionando uma maior comodidade para o paciente, com segurança e eficácia terapêutica;

Sugerimos a realização de estudos clínicos objetivando avaliar *in vivo* a eficácia terapêutica do produto desenvolvido.

Capítulo VIII

Referências Bibliográficas

8.1. Referências Bibliográficas

Adams EB, Macleod IN. Invasive amebiasis. I. Amebic dysentery and its complications. *Medicine (Baltimore)* 1977b 56(4): 315-23.

Ali MS, Saleem M, Ahmad W, Parvez M, Yamdagni RA. A chlorinated monoterpene ketone, acylated β -sitosterol glycosides and a flavonone glycoside from *Mentha longifolia* (Lamiaceae). *Phytochemistry* 2002 Abr; 59: 889-95.

Amorozo MCM. Plantas Medicinais-Conservação de Recursos. *Inf Fund Bras P Med* 1989; 1(1): 3.

Ansari MA, Vasudevan P, Tandon M, Razdan RK. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresour Technol* 2000 Fev; 71(3): 267-71.

A.O.A.C. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. 19^a ed. 2012.

Aristizabal H, Acevedo J, Botero M. Fulminant amebic colitis. *World J Surg* 1991; 15(2): 216-21.

Balbach A. A Flora Nacional na Medicina Doméstica. 23^aed. São Paulo: Editora MVP; 1988.

Bank DGB, Marks IN, Stein D. The clinical spectrum of amoebic colitis. *S Afr Med* 1971 Mar; 45(9): 218-25.

Bardonet PL, Faivre V, Pugh WJ, Piffaretti JC, Falson F. Gastro-retentive dosage forms: overview and special case of *Helicobacter pylori*. *J Control Release* 2006 Mar; 111: 1-18.

Baser KHC, Kurkcuglu M. Essential oils of *Mentha* species from Northern Turkey. *J Essent Oil Res* 1999 Set/Out; 11: 579-88.

Baumgartner S, Kristl J, Vrecer F, Vodopivec P, Zorko B. Optimisation of floating matrix tablets and evaluation of their gastric residence time. *Int J Pharm* 2000 Out; 195: 125-35.

Benetton ML, Gonçalves AV, Meneghini ME, Silva EF, Carneiro M. Risk factors for infection by the *Entamoeba histolytica*/*E. dispar* complex: an epidemiological study conducted in outpatient clinics in the city of Manaus, Amazon Region, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg 2005 Jul; 99(7): 532-40.

Bettini R, Catellani P L, Santi P, Peppas NA, Colombo P. Translocation of drug particles in HPMC matrix gel layer: effect of drug solubility and influence on release rate. J Control Release Amsterdam 2001 Fev; 70(3): 383-91.

Blessmann J, Tannich E. Treatment of asymptomatic intestinal *Entamoeba histolytica* infection. N Engl J Med 2002 Out; 347: 1384.

Bortoluzi P, Laporta, LV. Equivalência Farmacêutica e Estudo Comparativo dos Perfis de Dissolução de Medicamentos Contendo Cimetidina. Disc. Scientia. Séria: Ciências da Saúde, Santa Maria 2008; 8(1): 21-38.

Cardoso JM, et al. Radiology of invasive amebiasis of the colon. Am J Roentgenol 1977 Jun; 128 (6): 935-41.

Carvalho MG, Silva MBS. Hematologia: técnicas laboratoriais e interpretação. Belo Horizonte: Imprensa Universitária; 1988.

Chueh HR, Zia H, Rhodes CT. Optimization of solatol floating and bioadhesive extended release tablet formulation. Drug Dev Ind Pharm 1995; 21(15): 1725-47.

Cooreman MP, Krausgrill P, Hengels KJ. Local gastric and serum amoxicillin concentrations after different oral application forms. Antimicrob Agents Chemother 1993 Jul; 37(7): 1506-9.

Coelho PMBS. Desenvolvimento de Formulações de Liberação Modificada de Ranitidina. [tese]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2007.

Costa AF. Farmacognosia. 3ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 1975.

Craveiros AA, Fernandes AG, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW, Machado MIL. Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste. 1ª ed. Fortaleza: UFC; 1981.

Craveiro AA, De Queiroz DC. Óleos Essenciais e Química Fina. *Qim. Nova* 1993; 16(3): 224-8.

Cury GC, Salles PGO, Reis MCW, Rego VM, Amdt AW, Souza-Filho CBA, et al. Prevalência da esquistossomose mansoni e de parasitoses intestinais em escolares da área rural do Município de Jaboticatubas, MG, 1992-1993. *Rev Soc Bras Med Trop* 1994 Out/Dez; 27(4): 217-20.

Dai KM. A preliminary study on species of genus *Mentha* cultivated in China. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1981; 16 (11): 849-59.

Diamond LS, Clark CG, Cunnick CC. YS, a casein-free medium for axenic cultivation of *Entamoeba histolytica*, related *Entamoeba*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 1995 Mai/Jun; 42 (3): 277-8.

Dua VK, Verma G, Agarwal DD, Kaiser M, Brun R. Antiprotozoal activities of traditional medicinal plants from the Garhwal region of North West Himalaya, India. *J Ethnopharmacol* 2011 Jun; 136 (1): 123-28.

Ellyson JH, Bezmalinovic Z, Parks SN, Lewis FR Jr. Necrotizing amebic colitis: a frequently fatal complication. *Am J Surg* 1986 Jul; 152 (1): 21-6.

Farmacopéia Brasileira 5ªed., I vol. Brasília: Editora Fiocruz; 2010.

Farmacopeia Portuguesa 9ªed., Lisboa: Infarmed – Ministério da Saúde; 2009.

Ferreira SH, Barata LES, Salles LM, Queiroz SRR, Heluy Neto NE, Corazza R, Farias RC. Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências; 1998.

Feitosa TMA, Albuquerque MCP. Avaliação da Susceptibilidade *in vivo* do *Schistosoma mansoni* frente ao óleo essencial de *Mentha crisper*. XIX CONIC - III CONITI - VII J; 2011; CTG UFPE Recife, Brasil.

Goole J, Deleuse P, Vanderbist F, Amighi K. New levodopa sustained-release floating minitabets coated with insoluble acrylic polymer. *European Journal of Pharmaceutics and*

Biopharmaceutics 2008 Jul; 68: 310-18.

Guimaraes S, Sogayar MIL. Occurrence of *Giardia lamblia* in children of municipal day-care centers from Botucatu, São Paulo State, Brazil. Rev Inst Med Trop São Paulo 1995 Nov/Dez; 37 (6): 501-6.

Guedes DN, Silva DF, Barbosa-Filho JM, Medeiros IA. Endothelium-dependent hypotensive and vasorelaxant effects of the essential oil from aerial parts of *Mentha x villosa* in rats. Phytomedicine 2003 Set; 11 (6): 490-7.

Hardman JG, Limbird L, Gilman AG. Goodman e Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 2003.

Hermann ECJ, Kucera LS. Antiviral substances in plants of the mint family (Labiatae). 3. Peppermint (*Mentha piperita*) and other mint plants. Proc Soc Exp Biol Med 1967 Mai; 124 (3); 874-8.

Hostettmann K, Queiroz EF, Vieira PC. A Importância das Plantas Medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. Série de Textos da Escola de Verão em Química – IV, São Carlos, UFSCAR, 2003.

Hussain AI, Anwar F, Nigam PS, Ashraf M, Gilani A H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. J Sci Food Agric 2010 Abr; 90: 1827-36.

Iscan G, Kirimer N, Kurkcuglu M, Baser KH, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. J Agric Food Chem 2002 Jul; 50 (14): 3943-46.

Ishida M, Abe K, Hashizume M, Kawamura M. A novel approach to sustained pseudoephedrine release: Differentially coated mini-tablets in HPMC capsules. Int J Pharmaceutics 2008 Jul; 359 (1-2): 46-52.

Jain SK, Awashi AM, Jain GP. Agrawal, Calcium silicate based microspheres of repaglinide for gastroretentive floating drug delivery: preparation and in vitro characterization. J Control Release 2005 Out; 107 (2): 300-9.

Jammal MA, Kenneth C, Boris R. Amebiasis presenting as rectal bleeding without diarrhea in childhood. J Pediatr Gastroenterol Nutr 1985 Abr; 4 (2): 294-6.

Junior CV, Bolzani VS. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. Qim. Nova 2006 Jun; 29 (2): 326-27.

Katiki LM, Chagas ACS, Bizzo HR, Ferreira JFS, Amarante AFT. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. Vet Parasitol 2011 Dez; 183(1-2): 103-8.

Kamkar A, Javan AJ, Asadi F, Kamalinejad M. The antioxidative effect of Iranian *Mentha pulegium* extracts and essential oil in sunflower oil. Food Chem Toxicol 2010 Jul; 48 (7): 1796-0.

Khan FA, Khan A, Hussain J, Khattak MR, Shah SM, Hassan M. Assessment of Antioxidant and Antibacterial Activities of *Mentha longifolia*. J Pharma Res 2011 Jul; 4 (7): 2338.

Khan KA. The Concept of Dissolution Efficiency. J Pharm Pharmacol 1975; 27: 48-9.

Kozan E, Küpeli E, Yesilada E. Evaluation of some plants used in Turkish folk medicine against parasitic infections for their in vivo anthelmintic activity. J Ethnopharmacology 2006 Mai; 108: 211-16.

Kokkini S, Karousou R, Lanaras T. Essential oils with 1,2-epoxy-p-menthane derivatives from *Mentha spicata* plants growing across the island of Crete. Botânica Acta 1997; 110 (2): 184-9.

Kuman S, Wahab N, Warikoo R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. Asian Pac J Tropical Biomed 2011 Abr; 1 (2): 85-8.

Lahlou S, Leão FLC, Cardoso JHL. Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* in DOCA-salt-hypertensive rats. Phytomedicine 2002; 9: 715-20.

Lee M, Lee J, Seo C, Ha H, Lee N, Shin H. Protective effects of *Mentha haplocalyx* ethanol extract (MH) in a mouse model of allergic asthma. *Phytother Res* 2011 Jun; 25 (6): 863-9.

Liberal JPM. Desenvolvimento e Caracterização de Comprimidos Matriciais de Dupla Camada Contendo Paracetamol [Dissertação]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto-Portugal; 2008.

Lopes CM, Lobo JMS, Pinto JF, Costa P. Compressed mini-tablets as a biphasic delivery system. *Int J Pharm* 2006 Mai; 323: 93-0.

Lopes CM, Lobo JMS, Pinto JF, Costa P. Formas Farmacêuticas de Liberação Modificada: Polímeros Hidrofílicos. *Rev. bras. cienc. farm.* 2005 Jun; 41 (2): 143-54.

Losi E, Bettini R, Santi, P, Sonvico F, Colombo G, Lofthus K, et al. Assemblage of novel release modules for the development of adaptable drug delivery systems. *J Control Release* 2006 Mar; 111 (1-2): 212-8.

Lorenzi H, Matos FJ. Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas. 2º ed. São Paulo; Nova Odessa; 2008.

Lorenzo D, Paz D, Dellacassa E, Davies P, Vila R, Canigueral S. Essential oils of *Mentha pulegium* and *Mentha rotundifolia* from Uruguai. *Braz Arch Biol Technol* 2002 Dez; 45 (4): 519-24.

Lyra MAM, Soares-Sobrinho JL, Brasileiro MT, Roca MFL, Barraza JA, Viana OS, et al. Sistemas Matriciais Hidrofílicos e Mucoadesivos para Liberação Controlada de Fármacos. *Lat Am J Pharm* 2007 Jul; 26 (5): 784-93.

Mahle F, Goelzer F, Adriano J, Felipe M, Vier N, Carli RBG, et al. Avaliação do Perfil de Dissolução de Comprimidos de Hidroclorotiazida Comercializados no Brasil. *Rev Ciênc Básica Apl* 2007 Abr; 28 (3): 265-71.

Macedo ITF, Bevilaqua CML, Oliveira LMB, Camurça-Vasconcelos ALF, Moraes SMM, Machado LKA, et al. In vitro activity of *Lantana camara*, *Alpinia zerumbet*, *Mentha villosa*

and *Tagetes minuta* decoctions on *Haemonchus contortus* eggs and larvae. Vet Parasitol 2012 Dez; 190 (3-4): 504-9.

Maggiore MA, Albanese AA, Gende LB, Eguaras MJ, Denegri GM, Elissondro MC. Anthelmintic Effect of *Mentha* spp. Essential oils on *Echinococcus granulosus* *protoscoleces* and *metacestodes*. Parasitol Res 2012 Ago; 110: 1103-12.

Malone RA. Pharmacological Approach to Natural Products Screening and Evaluation. In: Warner H.; Wolf, P. New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutically Activity. Springer – Verlag: Berlim, 1977.

Manual Prático de Análise de Água, 2ª ed., Brasília, 2006.

Martinez IJ, Barreda TQ, Robles LV. Sustained delivery of captopril from floating matrix tablets. Int J Pharm 2008 Out; 362 (1-2): 37-3.

Merritt RJ, Coughlin E, Thomas DW, Jariwala L, Swanson V, Sinatra FR. Spectrum of amebiasis in children. Am J Dis Child 1982 Set; 136 (9): 785-9.

Miller LC, Tainter ML. Estimation of the ED₅₀ and error by means of logarithmic probit graph paper. Proc Soc Exp Biol Med 1944 Nov; 57: 261-4.

Mitruka BM, Rawnsley, Howard M, Vadehra BV. Clinical biochemical and hematological reference values in normal experimental animals. New York: Masson Publishing; 1977.

Monteiro CA, Medina MCG, Benicio MHD, Meyer M. Estudo das condições de saúde das crianças do município de São Paulo (Brasil), 1984/1985. IX – Cobertura e Qualidade da Assistência Materno-Infantil. Rev Saúde Publ 1988; 22 (3): 170-8.

Monteiro CA. Velhos e novos males da saúde no Brasil – A evolução do País e de suas doenças. 1ª ed. São Paulo: Hucitec; 1995.

Munday DL. Film coated pellets containing verapamil hydrochloride: enhanced dissolution into neutral médium. Drug Dev Ind Pharm 2003 Mai; 29 (5): 573-83.

Nair AGR, Gunasegaran R. Rare flavone glucuronides from *Mentha spicata*. Current Science 1981; 50 (4): 181-91.

Narranjo JP, Salvado AC, Ruiz CM, Martin SM. Efecto antidiarreico de La tintura AL 20% de *Mentha piperita* Linn em ratas. Rev Cubana de Farm 2004 Ago; 38 (2).

Nascimento EM. Avaliação do Efeito Anti-helmíntico do Hidrolato de *Mentha villosa* Huds. (Lamiaceae) em Nematóides Gastrointestinais de Bovinos. [Dissertação]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2008.

Neves DP, David PN, Alan LM, Pedro ML, Ricardo WAV. Parasitologia Humana. 11ªed. São Paulo: Atheneu; 2010.

Neuman RD, Moores SR, Lima AAM, Nataro JP, Guerrant RL, Sears CL. A longitudinal study of *Giardia lamblia* infection in north-east Brazilian children. Trop Med Int Health 2001 Ago; 6 (8): 624-34.

Oka Y, Nacar S, Putievsky E, Ravid U, Yaniv Z, Spiegel Y. Nematicidal Activity of Essential Oils and Their Components Against the Root-Knot Nematode. Phytopatology 2000 Mar; 90: 710-15.

Oliveira CHB. Frequência de Enteroparasitoses em Usuários do Serviço Público de Saúde na Mesorregião do Oeste Potiguar [Dissertação]. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte; 2013.

Oumzil H, Ghouli S, Rhajaoui M, Ilidrissi A, Fkih-Tetorian S, Farid M, et al. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils of *Mentha suaveolens*. Phytother Res 2002 Dez; 16 (8): 727-31.

Pezzini BR, Silva MAS, Ferraz HG. Formas farmacêuticas sólidas orais de liberação prolongada: sistemas monolíticos e multiparticulados. Rev. bras. cienc. farm. 2007 Out/Dez; 43 (4): 491-2.

Pedrazzani ES, Mello DA, Pripas S, Fucci M, Barbosa CAA, Santoro MCM. Helmintoses intestinais. II Prevalência e correlação com renda, tamanho da família, anemia e estado nutricional. Rev. saúde pública 1988 Out; 22 (5): 384-89.

Pianowski LF. Desenvolvimento Farmacêutico de um Produto Fitoterápico [Tese]. Porto: Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto; 2000.

Prista LVN, Neves AC, Morgado, RMR, Lobo JS. Tecnologia Farmacêutica. 5ª ed., 3 vol. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian; 2008.

Ravdin JL. Diagnosis of invasive amebiasis – time to end morphology era. Gut 1994 Ago; 35 (8): 1018-21.

Ravdin JL. Amebiasis. Clin Infect Dis 1995; 20 (6): 1453-66.

Resolução RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

Rouge N, Buri P, Doelker E. Drug absorption sites in the gastrointestinal tract and dosage forms for site-specific delivery. Int J Pharm 1996 Jun; 136 (1-2): 117-39.

Salata E, Corrêa FMA, Sogayar R, Sogayar MIL, Barbosa MA. Inquérito parasitológico na Cecap.- Distrito-sede de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. Rev. saúde pública 1972; 6 (4): 385-92.

Santos FL. Implantação e avaliação do diagnóstico diferencial entre *Entamoeba histolytica* e *Entamoeba dispar* em amostras fecais [Dissertação]. Salvador: Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia; 2007.

Santos FLNS, Soares NM. Mecanismos Fisiopatogênicos e Diagnóstico Laboratorial da Infecção Causada pela *Entamoeba histolytica*. J Bras Med Lab 2008 Ago; 44 (4): 249-61.

Salomen JL, Doelker E. Formulation of sustained release tablets. I. Inert matrices. Pharm Acta Helv 1980; 55 (7): 174-82.

Serra CHR, Storpidis S. Comparação de perfis de dissolução da cefalexina através de estudos de cinética e eficiência de dissolução (ED%). Rev. bras. cienc. farm. 2007 jan/mar; 43 (1): 79-88.

Sato Y, Kawashima Y, Takeuchi H, Yamamoto H. In vitro and in vivo evaluation of

riboflavin – containing microballoons for a floating controlled drug, delivery system in healthy humans. Int J Pharm 2004 Mai; 275 (1-2): 97-7.

Schumacher A, Reichling J, Schnitzler P. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. Phytomedicine 2003; 10 (6-7): 504-10.

Seta Y, Higuchi F, Kawahara Y, Nishimura K, Okada R. Design and preparation of captopril sustained-release dosage forms and their biopharmaceutical properties. Int J Pharm 1988 Fev; 41 (3): 245-54.

Shimizu S. Studies o mints containing dextro- or levo-rotatory linalool as a dominant constituent in the essential oils. Kiyo – Iida Joshi Tanki Daigaku 1988; 9: 24-33.

Singh BN, Kim KH. Floating drug delivery systems: an approach to oral controlled drug delivery via gastric retention. J Control Release 2000 Fev; 3 (63): 235-59.

Singh V, et al. Antimicrobial activity of *Mentha arvensis* against clinical isolates of human cariogenic pathogens-an in-vitro study. Int J of Pharm Sci Res 2012; 3 (5): 1355.

Siepmann J, Peppas NA. Mathematical Modeling of Controlled Drug Delivery. Adv Drug Deliv Rev 2001; 48(2-3): 137-138.

Silva RLC. Constituintes do Óleo Essencial, Propriedades Alimentícias e Farmacológicas de *Mentha Crispa* L. [Dissertação]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2004.

Silva AG, Albuquerque MCP. Avaliação da Susceptibilidade *in vitro* do *Schistosoma mansoni* frente ao Óleo Essencial e Extrato Hidroalcoólico de *Mentha crispa*. XIX CONIC - III CONITI - VII J; 2011; CTG UFPE Recife, Brasil.

Silva N. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. Valéria Christina Amstalden – São Paulo: Livraria Varela, 1997, 31p.

Simões CMO, Schemkel EP, Gosman G, De Melo JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia da Planta ao Medicamento. 1ª Ed. Porto Alegre: Editora da Universidade; 1999.

Stanley SL. Pathophysiology of amoebiasis. Trends Parasitology 2001 Jun; 17 (6): 280-85.

Sungthongjeen S, Sriamornsak P, Puttipipatkachorn S. Design and evaluation of floating multi-layer coated tablets based on gas formation. Eur J Pharm Biopharm 2008 Mai; 69 (1): 255-63.

Sylianco CYL, Blanco FR, Lim CM. Mutagenicity, clastogenicity and antimutagenicity of medicinal plant tablets produced by the NSTA pilot plant IV, Yerba briena tablets. Phillipp J Sci 1986; 115: 299-305.

Tachibana H, Kobayashi S, Nakakura K, Kaneda Y, Takeuchi T. Asymptomatic cyst passers of *Entamoeba histolytica* but not *Entamoeba dispar* in institutions for the mentally retarded in Japan. Parasitol Inter 2000 Mar; 49 (1,3): 31-5.

Taher YA. Antinociceptive activity of *Mentha piperita* leaf aqueous extract in mice. Libyan Journal of Medicine 2012; 7 (0): 1.

Takahashi T, Gamboa-Domingues A, Gomes-Mendez TJ, Remes JM, Rembis V, Martinez-Gonzalez D et al. Fulminant amebic colitis: analysis of 55 cases. Dis Colon Rectum 1997 Nov; 40 (11): 1362-7.

Tellez A, Morales W, Rivera T, Meyer E, Leiva B, Linder E. Prevalence of intestinal parasites in the human population of Leon, Nicaragua. Acta Trop 1997 Set; 66 (3): 119-25.

Telles NSB, Fachine FV, Viana FAC, Viana IOL, Nascimento DF, Leite ALAS, et al. Evaluation of the therapeutic efficacy of *Mentha crispa* in the treatment of giardiasis. Contemporary Clinical Trials 2011 Ago; 32: 809-13.

Tyler VE. The honest herbal. 3^a ed. Pharmaceutical Products Press: Binghamton, NY; 1993.

Yang L, Eshraghi J, Fassihi RA. A New intragastric delivery system for the treatment of *Helicobacter pylori* associated gastric ulcer: in vitro evaluation. J Control Release 1999 Fev; 57 (3): 215-22.

Yadegarina D, Gachkar L, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rassoli I. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. *Phytochemistry* 2006; 67 (12): 1249-55.

Yamasaki K, Nakano M, Kawahata T, Mori H, Otake T, Ueba N, et al. Anti-HIV-1 activity of herbs in Lamiaceae. *Biol Pharm Bull* 1998 Ago; 21 (8): 829-33.

Umamaheshwari RB, Jain S, Bhadra D, Jain NK. Floating microspheres bearing acetohydroxamic acid for the treatment of *Helicobacter pylori*. *J Pharm Pharmacol* 2003 Dez; 55 (12): 1607-13.

United States Pharmacopoeia, 34 ed. vol I Twinbrook Park Way Rockville, 2011.

Ullah N, Khurram M, Amin MU, Khan TA, Khayyam SU, Khan FA, et al. Impact of geographical locations on *Mentha spicata* antibacterial activities. *J Med Plants Res* 2012 Fev; 6 (7): 1201-6.

Vinha C, Martins MRS. Parasitoses intestinais entre escolares. *J. pediatr.* 1981; 50: 79-84.

Werkema MCC, Aguiar S. *Análise de regressão: como entender o relacionamento entre as variáveis de um processo*. 1ª ed., Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2006.

Whitehead L, Fell JT, Collet JH, Shama HL, Smith, A. Floating dosage forms: an in vivo study demonstrating prolonged gastric retention. *J Control Release* 1998 Out; 55 (1): 3-12.

WHO (1997). Amoebiasis — an expert consultation. World Health Organization, Weekly Epidemiological Record Nº 14. Geneva, April.

World Health Organization (WHO). Prevention and control of intestinal parasitic infections report of a WHO Expert Committee. Geneva, 1987. (technical report series, 749).

Wurster DE, Alkhamis KA, Matheson LE. Prediction of the adsorption of diazepam by activated carbon in aqueous media. *J Pharm Sci* 2003 Out; 92 (10): 2008-16.

WWW.astral.oxygenio.com/aromaterapia/artigo-historia-da-aromaterapia (Acedido em 13/03/2013)

www.portaleducacao.com.br/farmacia/artigos/16710/a-história-da-fitoterapia (Acedido em 13/03/2013)

Apêndice I

Protocolos e Relatório de Validação Analítica do Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona
no Óleo Essencial da *Mentha crisper* L. e nos Comprimidos Flutuantes de Libertação
Modificada

PROTOCOLO

VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DO ATIVO/MARCADOR ÓXIDO DE PIPERITENONA NO ÓLEO ESSENCIAL DA *Mentha crispa* L.

1. Objetivo

Descrever os procedimentos analíticos e critérios de aceitação adotados na validação da metodologia analítica para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispera*, utilizando o método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essa metodologia será avaliada através dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão, exatidão, intervalo e robustez, de acordo com a United States Pharmacopeia Edição 34, 2011 que harmoniza as informações do ICH – International Conference on Harmonization sobre validação de procedimento analítico.

2. Parâmetros Avaliados

De acordo com a USP 34, 2011 para validação de método analítico, os testes são classificados em 4 categorias, conforme a **tabela 1**.

Tabela 1 - Classificação dos testes segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na **tabela 2**.

Tabela 2 - Ensaio necessários para a validação do método analítico segundo sua finalidade.

Parâmetro		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de Detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

De acordo com as **tabelas 1 e 2** a validação do método analítico para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa* se enquadra na categoria 1. Portanto, serão avaliados os seguintes parâmetros: Especificidade, linearidade, intervalo, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

2.1. Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

A avaliação da especificidade do método analítico para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial de *Mentha crispa* L, será realizada através da injeção da fase móvel (Ver item 2.7), amostra do óleo essencial da *Mentha crispa*, padrão de óxido de piperitenona e análise em DAD (Pureza do pico).

2.1.1. Procedimento

Preparo do padrão de óxido de piperitenona

Pesar cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Pipetar 1 mL e transferir para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45µm. Injetar em HPLC.

Concentração final = 0,3740 mg/mL

Preparo da amostra do óleo essencial da *Mentha crispa*

Pesar 36,8 mg do óleo essencial da *Mentha crispa* e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Pipetar 1 mL e transferir para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar em HPLC.

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.7.

2.1.2. Critério de Aceitação

No cromatograma da fase móvel não deve haver nenhum pico no mesmo tempo de retenção que o pico do ativo/marcador óxido de piperitenona. Caso haja um pico com o mesmo tempo de retenção, a área deste deve ser inferior à 2% do valor obtido para o pico do cromatograma obtido no óleo essencial da *Mentha crispera*.

O resultado da análise em DAD deverá apresentar uma pureza de pico de no mínimo 90%.

2.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 5 concentrações diferentes.

A linearidade do método analítico será definida baseada em dados de uma curva de calibração construída com 5 concentrações diferentes, com três réplicas cada, preparadas a partir de uma solução mãe do padrão de óxido de piperitenona.

A linearidade será verificada contemplando os seguintes níveis de concentração 80, 90 100, 110 e 120 % do valor específico.

2.2.1. Procedimento

Preparo do padrão de óxido de piperitenona (Solução mãe)

Pesar cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar.

Preparo das soluções

Solução 80%

Transferir 0,8 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC. Concentração final: 0,2992 mg/mL

Solução 90%

Transferir 0,9 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC. Concentração final: 0,3366 mg/mL

Solução 100%

Transferir 1,0 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC. Concentração final: 0,3740 mg/mL

Solução 110%

Transferir 1,1 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC. Concentração final: 0,4114 mg/mL

Solução 120%

Transferir 1,2 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC. Concentração final: 0,4488 mg/mL

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.7.

2.2.2. Critério de Aceitação

Coeficiente de correlação linear (r) de no mínimo 0,99.

Coeficiente de correlação linear (r^2) de no mínimo 0,98.

2.3. Intervalo

O intervalo especificado é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior de um método analítico. Normalmente é derivado do estudo de linearidade e depende da aplicação pretendida do método (**Tabela 3**). É estabelecido pela confirmação de que o método apresenta exatidão, precisão e linearidade adequados quando aplicados a amostras contendo quantidades de substâncias dentro do intervalo especificado.

Tabela 3 - Limites percentuais do teor do analito que devem estar contidos no intervalo de linearidade para alguns métodos analíticos.

Ensaio	Alcance
Determinação Quantitativa do Analito em Matérias-primas ou em Formas Farmacêuticas	De 80% a 120% da concentração teórica do teste
Determinação de Impurezas	Do nível de impureza esperado até 120% do limite máximo especificado. Quando apresentarem importância toxicológica ou efeitos farmacológicos inesperados, os limites de quantificação e detecção devem ser adequados às quantidades de impurezas a serem controladas.
Uniformidade de Conteúdo	De 70% a 130% da concentração teórica do teste
Ensaio de Dissolução	De $\pm 20\%$ sobre o valor especificado para o intervalo. Caso a especificação para a dissolução envolva mais que um tempo. O alcance do método deve incluir -20% sobre o menor valor e $+20\%$ sobre o maior valor.

2.3.1. Procedimento

Preparo do padrão de óxido de piperitenona

Pesar cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol, homogeneizar.

Preparo da amostra do óleo essencial da *Mentha crisper* (Solução mãe)

Pesar 36,8 mg do óleo essencial da *Mentha crisper* e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar.

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.7.

Preparo das soluções

Solução 80%

Transferir 0,8 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.

Solução 90%

Transferir 0,9 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.

Solução 100%

Transferir 1,0 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.

Solução 110%

Transferir 1,1 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.

Solução 120%

Transferir 1,2 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.7.

2.3.2. Critério de Aceitação

De acordo com a tabela 3 será aceito de 80 a 120% da concentração teórica do teste.

2.4. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

Repetibilidade (precisão intracorrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média

e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

Precisão intermediária (precisão intercorrida): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro. A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

$$\text{DPR} = \frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \times 100$$

2.4.1. Procedimento

A repetibilidade do método será avaliada através de seis determinações a 100 % da concentração do teste com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A precisão intermediária será determinada com a realização das análises por um segundo analista em dia diferente.

Preparo da amostra do óleo essencial da *Mentha crisper*

Pesar seis amostras de 36,8 mg do óleo essencial da *Mentha crisper* e transferir para seis balões volumétricos de 10 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar. Pipetar 1 mL e transferir para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume com metanol, homogeneizar. Filtrar com filtro de 0,45 µm e injetar três réplicas de cada amostra em HPLC.

Preparo do padrão de óxido de piperitenona

Pesar cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Pipetar 1 mL e transferir para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar em HPLC. Concentração final = 0,3740 mg/mL. As condições cromatográficas encontra-se no item 2.7.

Realizar o mesmo procedimento de preparo da amostra e do padrão, com analista diferente em dia diferente, utilizando o mesmo equipamento de HPLC.

2.4.2. Critério de Aceitação

Para que o método seja considerado preciso é necessário que o coeficiente de variação ou desvio padrão relativo seja $\leq 5\%$.

2.5. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

2.5.1. Procedimento

Para avaliar a exatidão das análises empregadas na metodologia analítica serão preparadas amostras do óleo essencial da *Mentha crisper* a 80, 100 e 120%.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

Preparo da amostra do óleo essencial da *Mentha crispa* (Solução 1)

Pesar 36,8 mg de óleo essencial de *Mentha crispa* e transferir para balão volumétrico 10 mL, diluir com metanol e homogeneizar.

Preparo do padrão de óxido de piperitenona (Solução 2)

Pesar 18,7 mg do padrão de óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico 10 mL, diluir com metanol e homogeneizar. Concentração final: 1,84 mg/mL.

Preparo da amostra a 80%: Tomar 0,5 mL da solução 1 e 0,3 mL da solução 2 e transferir para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Concentração teórica: 0,2962 mg/mL de óxido de piperitenona.

Preparo da amostra a 100%: Tomar 0,5 mL da solução 1 e 0,5 mL da solução 2 e transferir para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Concentração teórica: 0,371 mg/mL de óxido de piperitenona.

Preparo da amostra a 120%: Tomar 0,5 mL da solução 1 e 0,7 mL da solução 2 e transferir para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Concentração teórica: 0,4458 mg/mL de óxido de piperitenona.

Filtrar todas as amostras com filtro de 0,45 µm e injetar três réplicas de cada amostra em HPLC.

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.7.

2.5.2. Critério de Aceitação

Os valores de recuperação individuais de cada repetição devem estar entre 95 a 105%.

Os valores de recuperação médios de cada pesagem devem estar entre 95 a 105%.

2.6. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

As variações dos parâmetros analíticos que são avaliados na robustez, estão na **tabela 4**.

Tabela 4 – Variações utilizadas no parâmetro robustez.

Parâmetro	Variação 1	Variação 2
Variação da Temperatura do Forno	20°C	30°C
Fluxo	0,8 mL	1,2 mL
Diferente Fabricante de Coluna	Varian lote nº 29-51-04 150 x 4,6 mm x ¼" Microsorb-MV 100-5 C18 R0086200D5	Phenomenex Gemini lote 548890-10 150 x 4,6 mm C18 REF OOF-4435-EO Código 101168601

2.6.1. Procedimento

Este parâmetro será realizado com duas injeções da amostra do óleo essencial da *Mentha crisper* na concentração de 100% (Ver item 2.4.1.).

2.7. Condições Cromatográficas

Equipamento: HPLC Merck Elite Modelo L 2200

Temperatura do forno do HPLC: 25 °C

Detector UV: 320 nm

Volume de injeção: 10 µL

Fluxo: 1 mL/min.

Canal A: Solução diluente

Água ultrapura 69 mL

Ácido fórmico 1 mL

Metanol grau HPLC 30 mL

Canal B: Metanol

Tabela 5 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de teor do ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper*.

Tempo (min.)	Canal A (%)	Canal B (%)
0	100	0
6	75	25
20	60	40

3. Instrumentos, Vidrarias e Equipamentos

Na validação da metodologia de análise do óxido de piperitenona no óleo essencial de *Mentha crispa*, serão utilizados instrumentos, equipamentos e vidrarias calibradas e/ou qualificados, quando necessário.

Padrão

Óxido de piperitenona
CPQBA 444/12 DQOF
Lote DQOF – 0003

Equipamentos

Balança analítica
Direct Q (Milli-Q)
HPLC Merck Elite Modelo L 2200

Reagentes

Metanol (grau HPLC)
Água ultrapura
Ácido fórmico

Materiais e Vidrarias

Vidro relógio
Funil de vidro
Espátula de aço inox
Aparato de filtração de vidro
Vials com tampa
Pipeta transferpette S de 100 - 1000µL
Balão volumétrico 5, 10 e 100 mL
Filtro Milex HN em nylon, 0,45 µm x 47 mm
Membrana filtrante em nylon, 0,45 µm x 47 mm
Coluna Varian Lote nº 29-51-04 150 x 4,6 mm x ¼" Microsorb-MV 100-5 C18 R0086200D5
Coluna Phenomenex Gemini, Lote 548890-10 150 x 4,6 mm C18 REF OOF-4435-EO
Código 101168601

4. Referências Bibliográficas

Resolução RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

United States Pharmacopoeia, 34 ed. vol I Twinbrook Park Way Rockville, 2011.

PROTOCOLO

**VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA ANALÍTICA DO
ATIVO/MARCADOR ÓXIDO DE PIPERITENONA NOS
COMPRIMIDOS FLUTUANTES DE LIBERTAÇÃO
MODIFICADA CONTENDO UM PARASITICIDA**

1. Objetivo

Descrever os procedimentos analíticos e critérios de aceitação adotados na validação da metodologia analítica para quantificar o óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida, utilizando o método da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essa metodologia será avaliada através dos parâmetros de especificidade, linearidade, precisão e exatidão de acordo com a United States Pharmacopeia Edição 34, 2011 que harmoniza as informações do ICH – International Conference on Harmonization sobre validação de procedimento analítico.

2. Parâmetros Avaliados

De acordo com a USP 34, 2011 para validação de método analítico, os testes são classificados em 4 categorias, conforme a **tabela 1**.

Tabela 1 - Classificação dos testes, segundo sua finalidade.

Categoria	Finalidade do Teste
I	Testes quantitativos para a determinação do princípio ativo em produtos farmacêuticos ou matérias-primas
II	Testes quantitativos ou ensaio limite para a determinação de impurezas e produtos de degradação em produtos farmacêuticos e matérias-primas
III	Testes de performance (por exemplo: dissolução, liberação do ativo)
IV	Testes de identificação

Para cada categoria será exigido um conjunto de testes, relacionados na **tabela 2**.

Tabela 2 - Ensaio necessários para a validação do método analítico, segundo sua finalidade.

Parâmetro		Categoria I	Categoria II		Categoria III	Categoria IV
			Quantitativo	Ensaio Limite		
Especificidade		Sim	Sim	Sim	*	Sim
Linearidade		Sim	Sim	Não	*	Não
Intervalo		Sim	Sim	*	*	Não
Precisão	Repetibilidade	Sim	Sim	Não	Sim	Não
	Intermediária	**	**	Não	**	Não
Limite de Detecção		Não	Não	Sim	*	Não
Limite de Quantificação		Não	Sim	Não	*	Não
Exatidão		Sim	Sim	*	*	Não
Robustez		Sim	Sim	Sim	Não	Não

* pode ser necessário, dependendo da natureza do teste específico.

** se houver comprovação da reprodutibilidade não é necessária a comprovação da Precisão Intermediária.

De acordo com as **tabelas 1 e 2** a validação do método analítico para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida se enquadra na categoria 1. Portanto, serão avaliados os seguintes parâmetros: Especificidade, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão e robustez.

2.1. Especificidade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz.

A avaliação da especificidade do método analítico para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos Comprimidos Flutuantes de Libertação Modificada Contendo um Parasiticida, foi realizada através da injeção do placebo, fase móvel (Ver item 2.6), padrão do óxido de piperitenona, amostra dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida e análise em DAD (Pureza do pico).

2.1.1. Procedimento

Preparo do padrão de óxido de piperitenona

Pesar cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Pipetar 1 mL e transferir para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar em HPLC.

Preparo da amostra dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida

Pesar 10 comprimidos e calcular o peso médio. Pulverizar e pesar 1,472 g do pó. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e diluir com metanol, completar o volume e homogeneizar. Pipetar 1 mL e transferir para balão volumétrico de 5mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar em HPLC.

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.6.

Preparo do Placebo

Pesar quantidade proporcional a um comprimido, de todos os excipientes do comprimido flutuante, HPMC K4M, celulose 102, lactose spray dry, estearato de magnésio, talco, ácido cítrico anidro, bicarbonato de sódio e aerosil (**Tabela 3**). Misturar, pesar 1,472 g do pó e transferir para balão volumétrico de 10 mL e diluir com metanol, completar o volume e homogeneizar. Pipetar 1mL e transferir para balão volumétrico de 5 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar em HPLC.

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.6.

Tabela 3 – Quantidades dos excipientes da formulação dos comprimidos flutuantes (Placebo).

Excipiente	Quantidade para 5 g de pó
HPMC K 4M	2,170 g
Celulose 102	2,055 g
Estearato de Magnésio	0,095 g
Talco	0,095 g
Ácido Cítrico	0,190 g
Bicarbonato de Sódio	0,190 g
Aerosil	0,050 g

2.1.2. Critério de Aceitação

Não deve haver nenhum pico com o mesmo tempo de retenção que o pico do óxido de piperitenona nos cromatogramas do placebo e da fase móvel. Caso haja um pico com o mesmo tempo de retenção, a área deste deve ser inferior a 2% do valor obtido para o pico da amostra detectada no comprimido flutuante.

O resultado da análise em DAD deverá apresentar uma pureza de pico de no mínimo 90%.

2.2. Linearidade

É a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado.

A linearidade do método analítico foi definida baseada em dados de uma curva de calibração construída com 5 concentrações diferentes, com três réplicas cada, preparadas a partir de uma solução mãe.

A linearidade será verificada contemplando os seguintes níveis de concentração 80, 90, 100, 110 e 120 % do valor específico.

2.2.1. Procedimento

Preparo do padrão de óxido de piperitenona (Solução mãe)

Pesar cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar.

Preparo das soluções

Solução 80%

Transferir 0,8 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.
Concentração final: 0,2992 mg/mL

Solução 90%

Transferir 0,9 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.
Concentração final: 0,3366 mg/mL

Solução 100%

Transferir 1,0 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.
Concentração final: 0,3740 mg/mL

Solução 110%

Transferir 1,1 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.
Concentração final: 0,4114 mg/mL

Solução 120%

Transferir 1,2 mL da solução mãe para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.

Concentração final: 0,4488 mg/mL

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.6.

2.2.2. Critério de Aceitação

Coeficiente de correlação linear (r) de no mínimo 0,99.

Coeficiente de correlação linear (r^2) de no mínimo 0,98.

2.3. Precisão

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Esta é considerada em três níveis.

Repetibilidade (precisão intracorrida): concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A repetibilidade do método é verificada por, no mínimo, 9 (nove) determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste.

Precisão intermediária (precisão intercorrida): concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes.

Para a determinação da precisão intermediária recomenda-se um mínimo de 2 dias diferentes com analistas diferentes.

Reprodutibilidade (precisão interlaboratorial): concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes como em estudos colaborativos, geralmente aplicados à padronização de metodologia analítica, por exemplo, para inclusão de metodologia em farmacopeias. Estes dados não precisam ser apresentados para a concessão de registro.

A precisão de um método analítico pode ser expressa como o desvio padrão ou desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas.

2.3.1. Procedimento

A repetibilidade do método será avaliada através de seis determinações a 100 % da concentração do teste com o mesmo analista e mesma instrumentação.

A precisão intermediária será determinada com a realização das análises por um segundo analista em dia diferente.

Preparo da amostra dos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida

Pesar 10 comprimidos e calcular o peso médio. Pulverizar e pesar 1,472 g do pó. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e diluir com metanol, completar o volume e homogeneizar. Pipetar 1mL e transferir para balão volumétrico de 5mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar em HPLC.

Preparo do padrão de óxido de piperitenona

Pesar cerca de 18,7 mg do padrão do óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico de 10 mL, completar o volume com metanol e homogeneizar. Coletar 1,0 mL, transferir para balão volumétrico de 5 mL e completar o volume com metanol, homogeneizar e filtrar com filtro de 0,45 µm. Injetar três réplicas em HPLC.

As condições cromatográficas encontra-se no item 2.6.

Realizar o mesmo procedimento de preparo da amostra e do padrão, com analista diferente em dia diferente, utilizando o mesmo equipamento de HPLC.

2.3.2. Critério de Aceitação

Para que o método seja considerado preciso é necessário que o coeficiente de variação (CV) seja $\leq 5\%$.

2.4. Exatidão

A exatidão de um método analítico é a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro.

A exatidão é calculada como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida do analito adicionado à amostra, ou como a diferença percentual entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescida dos intervalos de confiança.

A exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa

pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente.

$$\text{Exatidão} = \frac{\text{Concentração Média Experimental}}{\text{Concentração Teórica}} \times 100$$

2.4.1. Procedimento

Para avaliar a exatidão das análises empregadas na metodologia analítica serão preparadas amostras do comprimido a 80, 100 e 120%.

Preparo da amostra dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida (Solução 1)

Pesar 10 comprimidos e calcular o peso médio. Pulverizar e pesar 1,472 g do pó. Transferir para balão volumétrico de 10 mL e diluir com metanol, completar o volume e homogeneizar.

Preparo do padrão de óxido de piperitenona (Solução 2)

Pesar 18,7 mg do padrão de óxido de piperitenona e transferir para balão volumétrico 10 mL, diluir com metanol e homogeneizar. Concentração final: 1,84 mg/mL.

Preparo da amostra a 80%: Tomar 0,5 mL da solução 1 e 0,3 mL da solução 2 e transferir para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Concentração teórica: 0,2962 mg/mL de óxido de piperitenona.

Preparo da amostra a 100%: Tomar 0,5 mL da solução 1 e 0,5 mL da solução 2 e transferir para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Concentração teórica: 0,371 mg/mL de óxido de piperitenona.

Preparo da amostra a 120%: Tomar 0,5 mL da solução 1 e 0,7 mL da solução 2 e transferir para balão volumétrico de 5 mL. Completar o volume com metanol e homogeneizar. Concentração teórica: 0,4458 mg/mL de óxido de piperitenona.

Filtrar todas as amostras e o padrão com filtro de 0,45 µm e injetar três réplicas de cada em HPLC. As condições cromatográficas encontra-se no item 2.6.

2.4.2. Critério de Aceitação

Os valores de recuperação individuais de cada repetição devem estar entre 95 a 105%.

Os valores de recuperação médios de cada pesagem devem estar entre 95 a 105%.

2.5. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos. Indica sua confiança durante o uso normal.

As variações dos parâmetros analíticos que foi avaliado na robustez, estão na **tabela 4**.

Tabela 4 – Variações utilizadas no parâmetro robustez.

Parâmetro	Variação 1	Variação 2
Variação da Temperatura	20°C	30°C
Fluxo	0,8 mL	1,2 mL
Diferente Fabricante de Coluna	Coluna Varian lote nº 29-51-04 150 x 4,6 mm x ¼" Microsorb-MV 100-5 C18 R0086200D5	Coluna Phenomenex Synergi lote nº 5343 -69 150 x 4,6 mm C18 ° Série 616811 - 6
Variação da Composição da Fase Móvel	Água, ácido fórmico e metanol (gradiente)	Água, ácido fosfórico e metanol (gradiente)

2.5.1. Procedimento

Este parâmetro será realizado com duas injeções da amostra dos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasitocida, na concentração de 100% (Ver item 2.3.1.).

2.6. Condições Cromatográficas

Equipamento: HPLC Merck Elite Modelo L 2200

Temperatura da coluna: 25 °C

Detector: 320 nm

Volume de injeção: 10 µL

Fluxo: 1 mL/min.

Canal A: Solução diluente

Água ultrapura 69 mL

Ácido fórmico 1 mL

Metanol grau HPLC 30 mL

Canal B: Metanol

Tabela 5 - Gradiente do fluxo nos canais do HPLC na análise de teor do ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasitídeo.

Tempo (min.)	Canal A (%)	Canal B (%)
0	100	0
6	75	25
20	60	40

3. Instrumentos, Vidrarias e Equipamentos

Na validação da metodologia de análise do óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes, serão utilizados instrumentos, equipamentos e vidrarias calibradas e/ou qualificados, quando necessário.

Padrão

Óxido de piperitenona

CPQBA 444/12 DQOF

Lote DQOF – 0003

Equipamentos

Balança analítica

Direct Q (Milli-Q)

Cromatógrafo líquido da marca Merck

Reagentes

Metanol (grau HPLC)

Água ultrapura

Ácido fórmico

Ácido fosfórico

Materiais e Vidrarias

Vidro relógio

Funil de vidro

Espátula de aço inox

Aparato de filtração de vidro

Vials com tampa

Pipeta transferpette S de 100 - 1000µL

Balão volumétrico 5, 10 e 100 mL

Filtro Millex HN em nylon, 0,45 µm x 47 mm

Membrana filtrante em nylon, 0,45 µm x 47 mm

Coluna Varian lote nº 29-51-04 150 x 4,6 mm x ¼" Microsorb-MV 100-5 C18 R0086200D5

Coluna Phenomenex Synergi lote nº 5343 -69 150 x 4,6 mm C18 ° Série 616811 - 6

4. Referências Bibliográficas

Resolução RE Nº 899, de 29 de Maio de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil.

United States Pharmacopoeia, 34 ed. vol I Twinbrook Park Way Rockville, 2011.

RELATÓRIO DE VALIDAÇÃO ANALÍTICA

**ATIVO/MARCADOR: ÓXIDO DE PIPERITENONA NO
ÓLEO ESSENCIAL DA *Mentha crisper* E NOS
COMPRIMIDOS FLUTUANTES DE LIBERTAÇÃO
MODIFICADA**

1. Objetivo

Apresentar os resultados das análises de validação do método analítico para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* e nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida, através do método por CLAE, conforme protocolos específicos.

2. Resultados Obtidos na Validação do Método Analítico para Quantificar o Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona no Óleo Essencial da *Mentha crisper*

Todos os procedimentos analíticos realizados durante a validação do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* e nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida, obedeceram ao que está estabelecido no protocolo específico.

2.1. Especificidade

A análise do cromatograma da fase móvel demonstra a inexistência de pico no tempo de retenção do ativo/marcador óxido de piperitenona, de acordo com a **figura 1**. Enquanto que nos cromatogramas do padrão e do óleo essencial da *Mentha crisper* aparece o pico no tempo de retenção de 11 minutos, correspondente ao ativo/marcador óxido de piperitenona de acordo com os cromatogramas referentes às **figuras 2 e 3**.

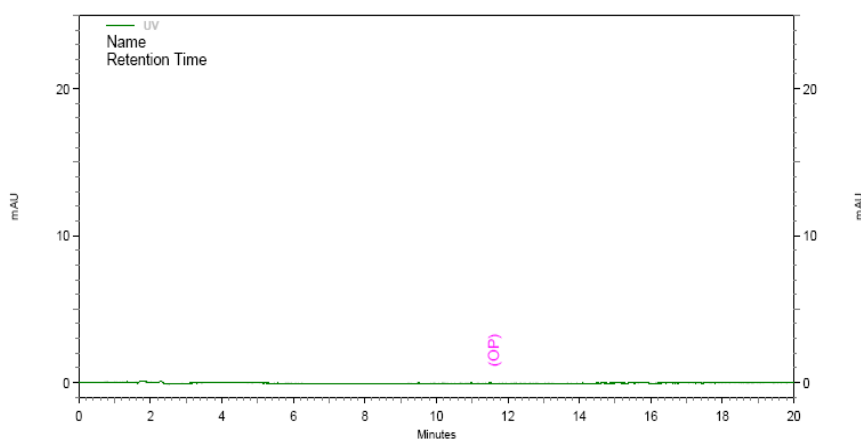


Figura 1 - Cromatograma da fase móvel gradiente ácido fórmico, metanol e água ultrapura obtido do HPLC Merck.

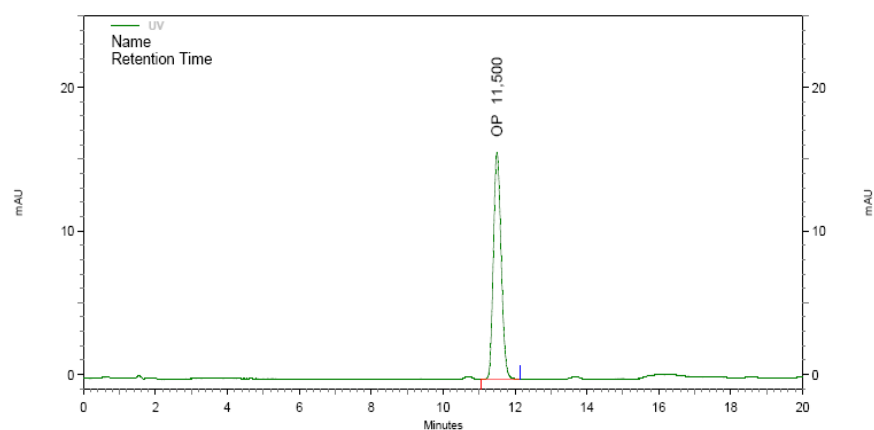


Figura 2 - Cromatograma do óleo essencial da *Mentha crisper* obtido do HPLC Merck.

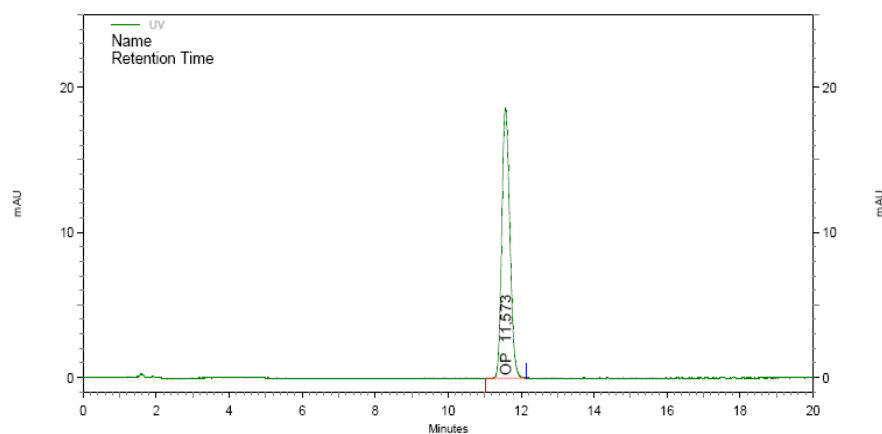


Figura 3 - Cromatograma do padrão do ativo/marcador óxido de piperitenona, obtido do HPLC Merck.

As análises em HPLC Merck com DAD (**Figuras 4 e 5**) mostraram uma pureza de pico de 93,947 %, demonstrando que não há outro pico coeluinto com o ativo/marcador óxido de piperitenona.

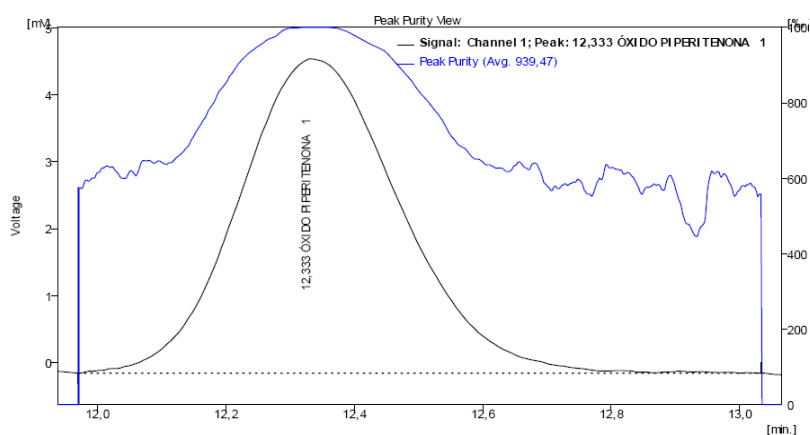


Figura 4 - Cromatograma do óleo essencial da *Mentha crisper* obtido através do HPLC Merck em DAD.

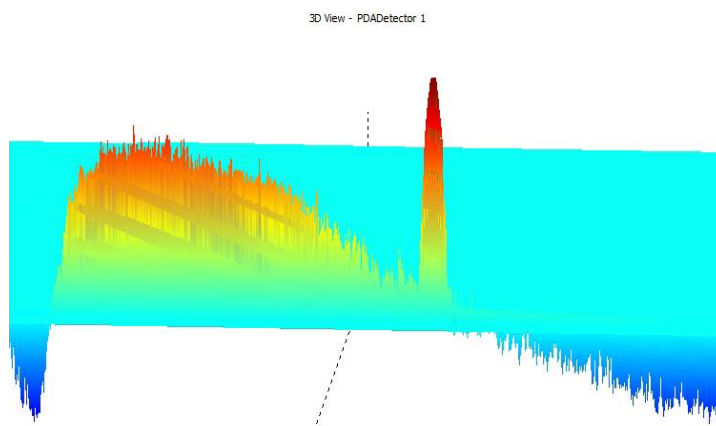


Figura 5 - Cromatograma do HPLC Merck figura em 3D do pico do óxido de piperitenona presente no óleo essencial da *Mentha crisper*.

2.1.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* é **específico**, em virtude de no cromatograma da fase móvel injetada, não apresentar nenhum pico no mesmo tempo de retenção que o pico do ativo/marcador óxido de piperitenona e o resultado da análise em DAD apresentar uma pureza de pico > 90%.

2.2. Linearidade

Os resultados obtidos nas análises para avaliação da linearidade do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* estão expressos na **tabela 1**.

Tabela 1 - Dados obtidos no parâmetro linearidade.

Nível	Amostras	Área do Cromatograma	Média das Áreas dos Cromatogramas	DPR(%)
80%	1	957486	982357	2,20
	2	997467		
	3	992119		
90%	1	1082609	1069639	0,25
	2	1071546		
	3	1067733		
100%	1	1188103	1173956	1,02
	2	1165440		
	3	1182473		
110%	1	1256672	1273265	0,52
	2	1277953		
	3	1268577		
120%	1	1389067	1398134	0,11
	2	1399262		
	3	1397006		

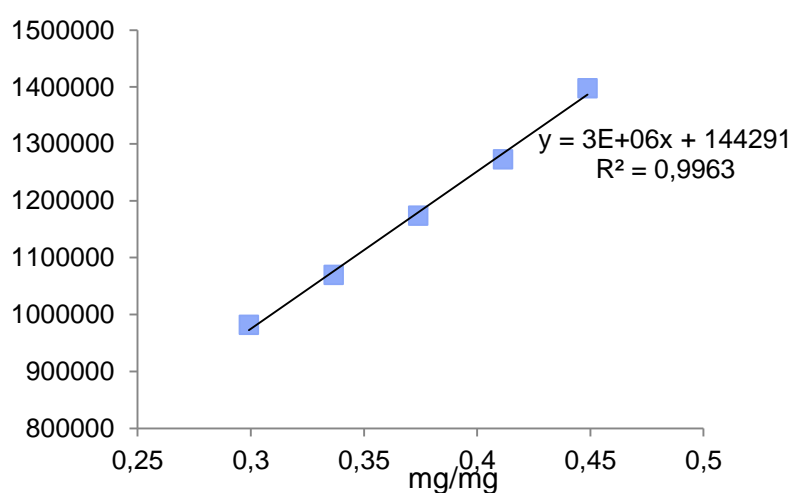


Figura 6 - Curva de linearidade para determinação do teor do óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper*.

2.2.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* é **linear**, pois apresentou coeficiente de correlação linear (r^2) $> 0,98$.

2.3. Intervalo

Os dados obtidos para avaliação do intervalo do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* estão presentes na **tabela 2**.

Tabela 2 - Dados obtidos no parâmetro intervalo.

Nível	Amostras	Área do Cromatograma	Média das Áreas dos Cromatogramas	DPR(%)
80%	1	808632	814765,7	1,237552
	2	809262		
	3	826403		
90%	1	904073	904482,3	0,570954
	2	909839		
	3	899535		
100%	1	964294	961763,7	0,247576
	2	961430		
	3	959567		
110%	1	1054127	1057367	0,283749
	2	1057926		
	3	1060049		
120%	1	1156544	1159097	0,198931
	2	1161028		
	3	1159719		

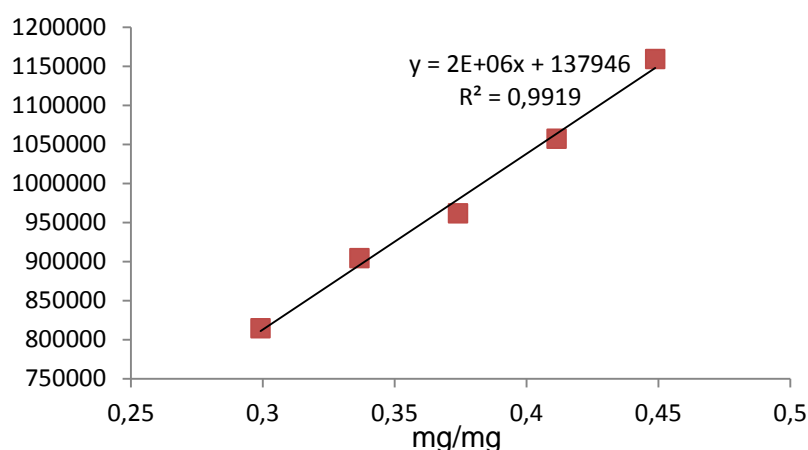


Figura 7 - Curva do intervalo para determinação do teor do óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa*.

2.3.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa* apresenta intervalo dentro da faixa 80 a 120%, conforme critério de aceitação presente no protocolo específico.

2.4. Precisão

Os resultados obtidos nas análises para avaliação da precisão do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa* estão expressos nas **tabelas 3, 4 e 5**.

Tabela 3 - Dados obtidos no parâmetro precisão intracorrida para a analista 1.

Analista	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/mg)
1	1	1016898	0,452
	2	1025408	0,456
	3	1032748	0,459
	4	1029006	0,458
	5	1055800	0,470
	6	1053322	0,467
Média			0,460333333
DP			0,006831301
DPR (%)			1,304

Tabela 4 - Dados obtidos no parâmetro precisão intracorrida para a analista 2.

Analista	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/mg)
2	1	1011423	0,459
	2	1003101	0,455
	3	1004978	0,456
	4	949550	0,430
	5	945508	0,429
	6	939442	0,426
Média			0,4425
DP			0,015630099
DPR (%)			3,39

Tabela 5 - Dados obtidos no parâmetro precisão intercorrida comparando-se os resultados das análises das analistas 1 e 2.

Analista	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/mg)
1	1	1016898	0,452
	2	1025408	0,456
	3	1032748	0,459
	4	1029006	0,458
	5	1055800	0,470
	6	1053322	0,467
2	1	1011423	0,459
	2	1003101	0,455
	3	1004978	0,456
	4	949550	0,430
	5	945508	0,429
	6	939442	0,426
Média			0,451
DP			0,014
DPR (%)			3,104

2.4.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* é **preciso**, pois apresenta desvio padrão relativo $\leq 5\%$, tanto para a precisão intracorrida quanto para precisão intercorrida.

2.5. Exatidão

Os resultados obtidos nas análises para avaliação da exatidão do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* estão expressos nas **tabelas 6, 7 e 8**.

Tabela 6 - Dados do parâmetro exatidão a 80%.

Nível	Réplica	Área do Cromatograma	Conc. (mg/mg)	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%	1	788162	0,357	77,81	97,26	97,45
	2	791465	0,358	78,10	97,62	
	3	790471	0,358	77,98	97,47	
					DP	0,180831
					DPR (%)	0,185563

Tabela 7 - Dados do parâmetro exatidão a 100%

Nível	Réplica	Área do Cromatograma	Conc. (mg/mg)	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100%	1	992501	0,449	97,92	97,92	98,04
	2	994578	0,450	98,16	98,16	
	3	993257	0,450	98,04	98,04	
					DP	0,12
					DPR (%)	0,122399

Tabela 8 - Dados do parâmetro exatidão a 120%

Nível	Réplica	Área do Cromatograma	Conc. (mg/ mg)	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
120%	1	1177687	0,533	116,21	96,84	97,3
	2	1183523	0,536	116,80	97,33	
	3	1188227	0,538	117,27	97,72	
					DP	0,440946
					DPR (%)	0,453197

2.5.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* é **exato**, pois apresentou recuperação entre 95 e 105% para os três níveis de concentração testados.

2.6. Robustez

Os resultados obtidos nas análises para avaliação da robustez do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* encontra-se nas **tabelas 9, 10 e 11**.

Tabela 9 - Resultados para variação do fluxo da fase móvel.

Variação	Amostra	Área do Cromatograma	Conc. (mg/mg)	Média	DPR (%)	DP
0,8 mL/min	1	1226775	0,501	0,502	0,422	0,00212
	2	1235888	0,504			
1,2 mL/min	1	835518	0,489	0,491	0,720	0,00354
	2	844405	0,494			

Tabela 10 - Resultados para variação da temperatura do forno do HPLC.

Variação	Amostra	Área do Cromatograma	Conc. (mg/mg)	Média	DPR (%)	DP
20 °C	1	1003387	0,492	0,489	0,736	0,00354
	2	994085	0,487			
30 °C	1	999873	0,493	0,496	0,865	0,00424
	2	1011206	0,499			

Tabela 11 - Resultados para diferente lote e fabricante de coluna cromatográfica.

Variação	Amostra	Área do Cromatograma	Conc. (mg/mg)	Média	DPR (%)	DP
Gemini Phenomene xC18, 5µ,110A°,1 50x 4,6mm RefOOF443 5-EO	1	1013673	0,502	0,501	0,14	0,000707
	2	1012734	0,501			

2.6.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa* é **robusto**, uma vez que a variação dos parâmetros descritos não interferiu significativamente nos resultados obtidos, apresentando concentração semelhante aos resultados obtidos seguindo as condições analíticas do método.

2.7. Conclusão final

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crispa* está validado, por atender os requisitos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade, intervalo e robustez de acordo com a USP 34, 2011.

3. Resultados Obtidos na Validação do Método para Quantificar o Ativo/Marcador Óxido de Piperitenona nos Comprimidos Flutuantes de Liberação Modificada Contendo um Parasiticida

3.1. Especificidade

A análise do cromatograma do placebo e da fase móvel demonstra a inexistência de pico no tempo de retenção do ativo/marcador óxido de piperitenona, de acordo com as **figuras 8 e 9**. Enquanto que nos cromatogramas do padrão e do comprimido flutuante aparece o pico no tempo de retenção de 11 e 12 minutos, correspondente ao ativo/marcador óxido de piperitenona de acordo com os cromatogramas referentes às **figuras 10 e 11**.

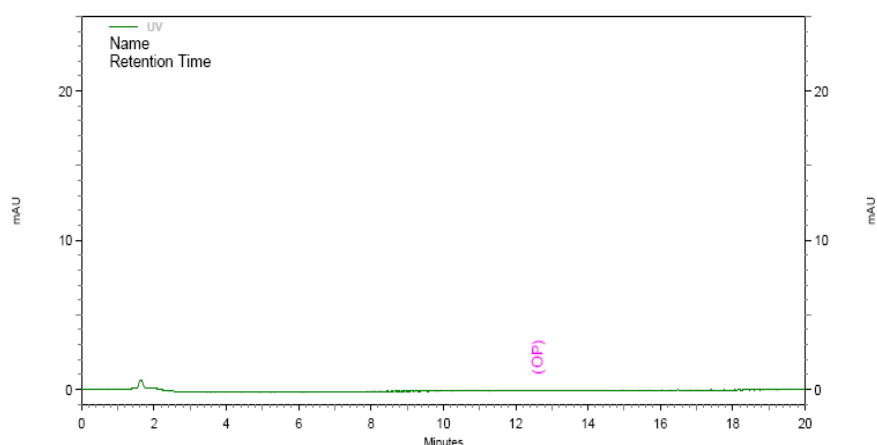


Figura 8 - Cromatograma do placebo obtido do HPLC Merck.

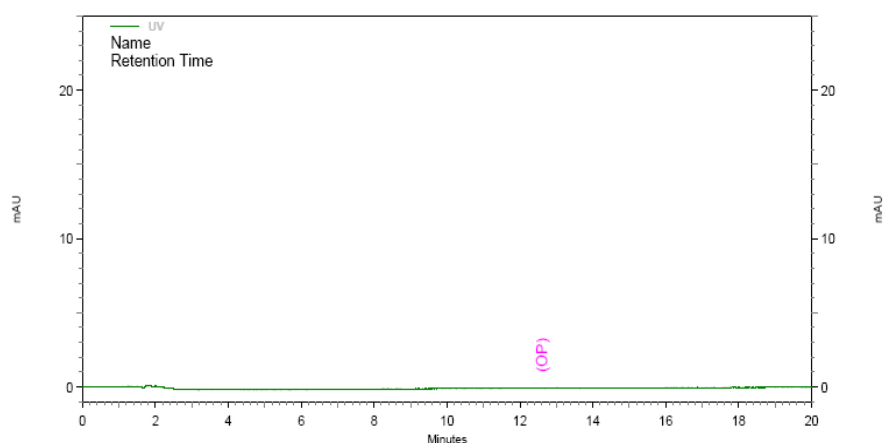


Figura 9 - Cromatograma da fase móvel gradiente ácido fórmico, metanol e água ultrapura obtido do HPLC Merck.

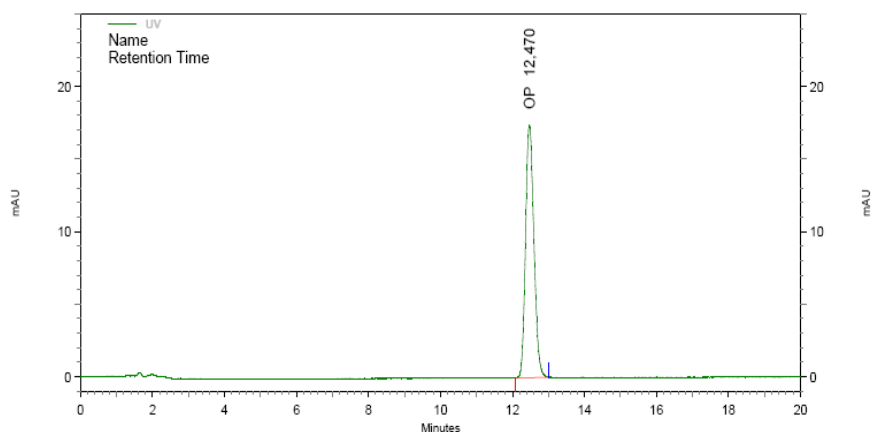


Figura 10 - Cromatograma do padrão do ativo/marcador óxido de piperitenona obtido do HPLC Merck.

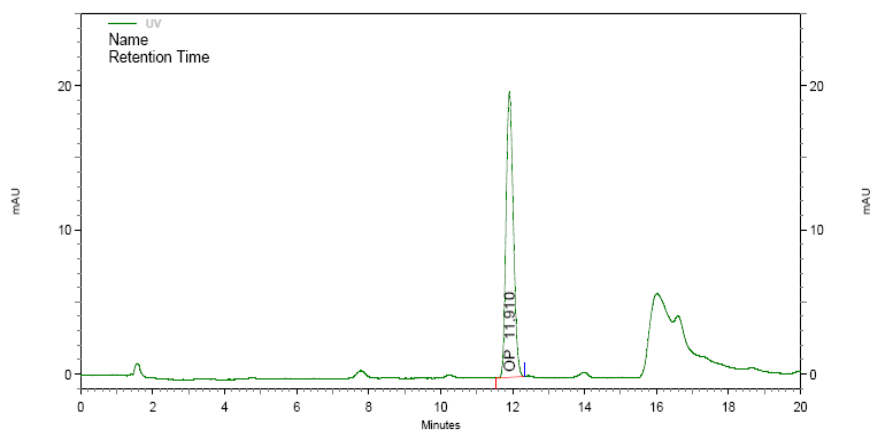


Figura 11 - Cromatograma do comprimido flutuante de liberação modificada contendo um parasiticida obtido do HPLC Merck.

As análises em HPLC Merck com DAD (**Figuras 12 e 13**) mostraram uma pureza de pico de 92,897 %, demonstrando que não há outro pico coeluinte com o ativo/marcador óxido de piperitenona.

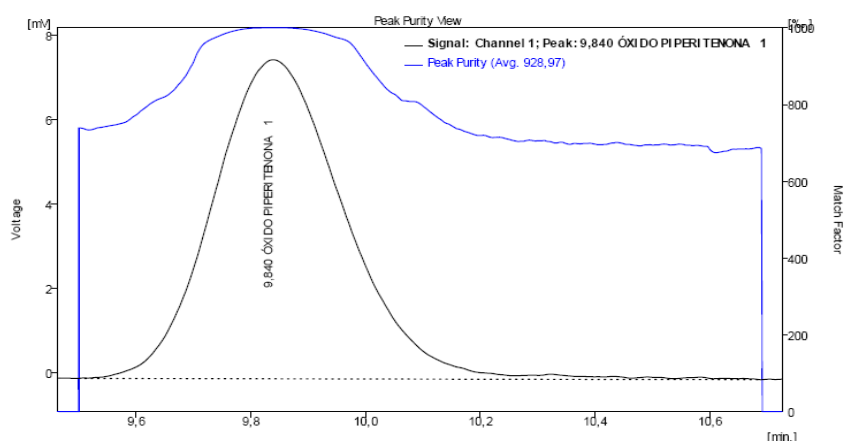


Figura 12 - Cromatograma do óleo essencial da *Mentha crisper* obtida através do HPLC Merck em DAD.

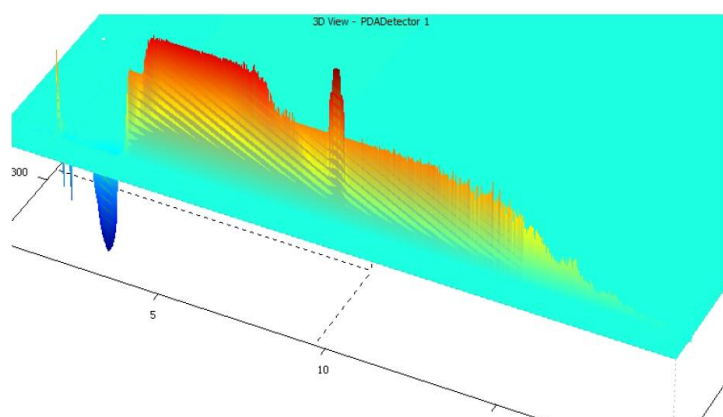


Figura 13 - Cromatograma do HPLC Merck figura em 3D do óxido de piperitenona presente no comprimido flutuante de libertação modificada contendo um parasiticida.

3.1.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no comprimido flutuante de libertação modificada contendo um parasiticida é **específico**, em virtude de no cromatograma do placebo e da fase móvel injetada, não apresentar nenhum pico no mesmo tempo de retenção que o pico do ativo/marcador óxido de piperitenona e o resultado da análise em DAD apresentar uma pureza de pico > 90%.

3.2. Linearidade

Foi considerado os mesmos dados obtidos nos testes para linearidade do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no óleo essencial da *Mentha crisper* em virtude do método apresentar a mesma faixa de linearidade.

3.3. Precisão

Os resultados obtidos nas análises para avaliação da precisão do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida estão presentes nas **tabelas 12, 13 e 14**.

Tabela 12 - Dados obtidos no parâmetro precisão intracorrida para a analista 1.

Analista	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)
1	1	1108525	17,39
	2	1114822	17,49
	3	1119040	17,56
	4	1115535	17,50
	5	1113776	17,48
	6	1129920	17,73
Média			17,525
DP			0,114324101
DPR (%)			0,652348649

Tabela 13 - Dados obtidos no parâmetro precisão intracorrida para a analista 2.

Analista	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)
2	1	1120130	17,29
	2	1118311	17,26
	3	1116905	17,24
	4	1130481	17,50
	5	1115064	17,48
	6	1121514	17,73
Média			17,41667
DP			0,190228
DPR (%)			1,092218

Tabela 14 - Dados obtidos no parâmetro precisão intercorrida comparando-se os resultados das análises das analistas 1 e 2.

Analista	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)
1	1	1108525	17,39
	2	1114822	17,49
	3	1119040	17,56
	4	1115535	17,50
	5	1113776	17,48
	6	1129920	17,73
2	1	1120130	17,29
	2	1118311	17,26
	3	1116905	17,24
	4	1130481	17,50
	5	1115064	17,48
	6	1121514	17,73
Média			17,47083333
DP			0,159969221
DPR (%)			0,915635891

3.3.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida é **preciso**, pois apresenta desvio padrão relativo $\leq 5\%$, tanto para a precisão intracorrida quanto para precisão intercorrida.

3.4. Exatidão

Os dados obtidos na avaliação deste parâmetro estão presentes nas **tabelas 15, 16 e 17**.

Tabela 15 - Dados do parâmetro exatidão a 80%.

Nível	Réplica	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
80%	1	909235	15,16	82,84	103,55	103,1333
	2	901978	15,04	82,18	102,72	
	3	905656	15,10	82,51	103,13	
					DP	0,41501
					DPR (%)	0,402401

Tabela 16 - Dados do parâmetro exatidão a 100%.

Nível	Réplica	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
100%	1	1126280	18,79	102,67	102,67	102,9433
	2	1124118	18,75	102,45	102,45	
	3	1137894	18,98	103,71	103,71	
					DP	0,673003
					DPR (%)	0,653761

Tabela 17 - Dados do parâmetro exatidão a 120%.

Nível	Réplica	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)	Teor (%)	Recuperação (%)	Recuperação média (%)
120%	1	1298380	21,65	118,3	98,58	98,50333
	2	1305650	21,77	118,96	99,13	
	3	1288196	21,48	117,37	97,80	
					DP	0,668306
					DPR (%)	0,678461

3.4.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no comprimido flutuante de liberação modificada contendo um parasiticida é **exato**, pois apresentou recuperação entre 95 e 105% para os três níveis de concentração testados.

3.5. Robustez

Os dados obtidos nos testes para avaliação da robustez do método para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de liberação modificada contendo um parasiticida encontra-se nas **tabelas 18, 19, 20 e 21**.

Tabela 18 - Resultados para variação do fluxo da fase móvel.

Variação	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)	Média	DPR (%)	DP
0,8 mL/min	1	1495438	20,72	21,05	2,217057	0,46669
	2	1543198	21,38			
1,2 mL/min	1	1027915	21,00	21,00	0,01818	0,003818
	2	1027649	21,00			

Tabela 19 - Resultados para variação da temperatura do forno do HPLC.

Variação	Amostra	Área do Cromatograma	Concentração (mg/1472mg)	Média	DPR (%)	DP
20 °C	1	1229933	20,95	20,91	0,270533	0,056569
	2	1225130	20,87			
30 °C	1	519247	8,16	8,20	0,68986	0,056569
	2	524194	8,24			

Tabela 20 - Resultados para diferente lote e fabricante de coluna cromatográfica.

Variação	Amostra	Área do Cromatograma	Conc. (mg/1472 mg)	Média	DPR (%)	DP
Gemini PhenomenexC18, 5µ, 110A°, 150x 4,6mm RefOOF-4435-EO	1	736116	11,89	11,90	0,118841	0,014142
	2	736116	11,91			

Tabela 21 - Resultados para variação da fase móvel.

Variação	Amostra	Área do Cromatograma	Conc. (mg/1472 mg)	Média	DPR (%)	DP
Água ultrapura, ácido fosfórico e metanol	1	515043	8,19	8,23	0,687346	0,056569
	2	520083	8,27			

3.5.1. Conclusão

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona no comprimido flutuante de libertação modificada contendo um parasiticida é **robusto**, no que se refere à mudança de fluxo e mudança de temperatura do forno do HPLC para 20°C conforme resultados estudados, porém o método não é considerado robusto para mudança de temperatura do forno do HPLC para 30°C, troca de coluna e mudança de fase móvel em razão de apresentar resultados com variação significativa da concentração média encontrada.

3.6. Conclusão final

O método proposto para quantificar o ativo/marcador óxido de piperitenona nos comprimidos flutuantes de libertação modificada contendo um parasiticida está validado, por atender os requisitos de linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez de acordo com a USP 34, 2011.

Apêndice II

Cópias dos Certificados do Padrão do Óxido de Piperitenona e dos Trabalhos
Publicados na Revista Brasileira de Toxicologia



FMQ-07
Emissão: CQT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/0

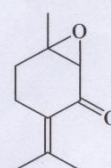
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 176/05 DQOF

PÁGINA: 2 de 4

OBTENÇÃO DO PADRÃO DE ÓXIDO DE PIPERITENONA

Produto:	ÓXIDO DE PIPERITENONA
Lote:	DQOF-0002
Quantidade:	5 frascos de 100mg
Método de análise:	GC-FID
Data da produção:	29/08/2005
Data da análise:	31/08/2005

Estrutura



Nome químico:	7-Oxabiciclo[4.1.0]heptan-2-ona,9-metil-3-(1-metiletilideno)
Fórmula molecular:	$C_{10}H_{14}O_2$
Massa molecular:	166,22
CAS #:	35178-55-3
Família química:	monoterpeno cetona
Origem:	Isolado do óleo essencial de <i>Mentha crisper</i>

Os resultados e conclusões deste relatório, bem como o nome do CPQBA/UNICAMP, não podem ser utilizados para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma. É vetado sua utilização parcial para qualquer fim. Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

NR



FMQ-07
Emissão: CQT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



Edição/Revisão: 2/0

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 176/05 DQOF

PÁGINA: 3 de 4

ANÁLISES

TESTES	RESULTADOS
GC - FID	96,40%
RMN ¹ H	De acordo (1,2)
RMN ¹³ C	De acordo (1,2)
IV (KBr)	De acordo (1)
$[\alpha]_D^{23} = +155$ (c = 0,4 - EtOH)	De acordo (1)
Espectro de massas	m/z (M ⁺ 166 ; 54%)
Aparência	Líquido incolor

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS:

Coluna capilar HP-5 (30 metros X 0,25 mm X 0,25 µm)

Temperaturas: Injetor = 220°C
Coluna = 60°C, 3°C min⁻¹, 240°C
Detetor = 250°C

Razão de split: 1:40

Volume injetado: 1,0 µL

Nota: A amostra foi injetada três vezes na concentração de 10mg/mL em hexano (grau HPLC) e o teor final do óxido de piperitenona foi expresso pela média das % das área obtidas.

Referências:

- 1- Ghoulami, S.; Idrissi, A. I.; Fkih-Tetouani, S. Synthèse de nouveaux hétérocycles à partir de l'óxido de pipéritenone. Tetrahedron Letters v. 42, 2107-2109, 2001.
- 2- Tripathi, A K.; Prajapati, V.; Ahmad, A.; Agagarwal, K. K.; Khanuja, S. P. S. Piperitenone Oxide as Toxic, Repellent, and Reproduction Retardant Toward Malarial Vector *Anophele stephensi* (Diptera:Anophelinae). Journal of Medical Entomology, vol 41, 691-698, 2004.

Os resultados e conclusões deste relatório, bem como o nome do CPOBA/UNICAMP, não podem ser utilizados para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma. É vetado sua utilização parcial para qualquer fim. Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

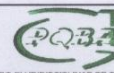


FMQ-07
Emissão: CQT

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



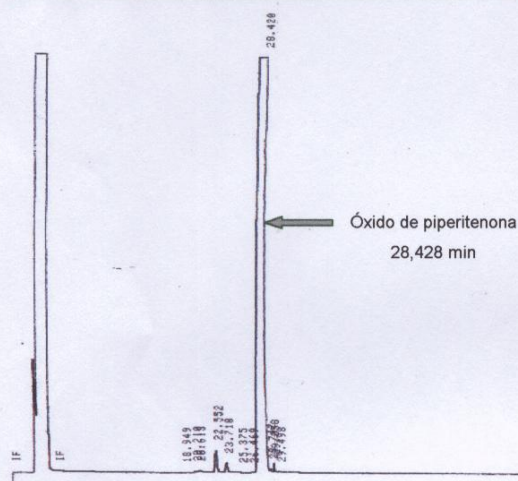
CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/0

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 176/05 DQOF

PÁGINA: 4 de 4

CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O ÓXIDO DE PIPERITENONA



Closing signal file M:SIGNAL .BNC

RUN# 46 AUG 31, 2005 11:43:53

SIGNAL FILE: M:SIGNAL.BNC

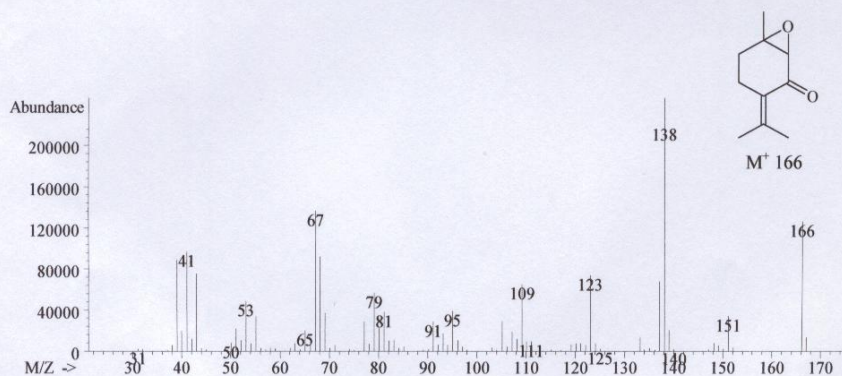
HEIGHT#

RT	HEIGHT	TYPE	WIDTH	HEIGHT%
18.349	1956	PS	.511	.02675
20.210	7925	PS	.137	.10839
20.610	9410	BB	.370	.12870
22.592	112010	PS	.267	1.53195
22.718	50453	PS	.268	.69004
25.375	2511	PS	.341	.03434
26.469	4691	BB	.334	.06416
28.420	7050432	BB	.690	96.53744
28.747	15005	VB	.089	.21616
29.058	41732	BF	.096	.57075
29.498	6676	BE	.103	.09131

TOTAL HEIGHT=7311500

UL FACTOR=1.0000E+00

ESPECTRO DE MASSAS DO ÓXIDO DE PIPERITENONA



Os resultados e conclusões deste relatório, bem como o nome do CPQBA/UNICAMP, não podem ser utilizados para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma. É vetado sua utilização parcial para qualquer fim. Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

FONE: (19) 3884 7500

FAX: (19) 3884 7811

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

Handwritten signature



UNICAMP

FMQ-07
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

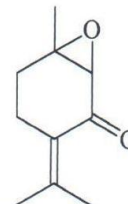
NÚMERO PROCESSO: CPQBA 444/12 DQOF

PÁGINA: 2 de 2

OBTENÇÃO DO PADRÃO DE ÓXIDO DE PIPERITENONA

Produto:	ÓXIDO DE PIPERITENONA
Lote:	DQOF-0003
Método de análise:	GC-FID
Data da produção:	06/08/2012
Data da análise:	08/08/2012

Estrutura



Nome químico:	7-Oxabiciclo[4.1.0]heptan-2-ona,9-metil-3-(1-metiletilideno)
Fórmula molecular:	C ₁₀ H ₁₄ O ₂
Massa molecular:	166,22
CAS #:	35178-55-3
Família química:	monoterpeno cetona
Origem:	Isolado do óleo essencial de <i>Mentha crisper</i>

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br



FMQ-07
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 444/12 DQOF

PÁGINA: 3 de 2

ANÁLISES

TESTES	RESULTADOS
GC - FID	98,20%
Espectro de massas	m/z (M^+ 166 ; 54%)
Aparência	Líquido incolor a temp. ambiente Cristais amorfos brancos a - 5°C

CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS:

Coluna capilar HP-5 (30 metros X 0,25 mm X 0,25 μ m)

Temperaturas: Injetor = 220°C; Coluna = 60°C, 3°C min⁻¹, 240°C; Detetor = 250°C

Razão de split: 1:40

Volume injetado: 1,0 μ L

Nota: A amostra foi injetada três vezes na concentração de 10mg/mL em acetato de etila PA e o teor final do óxido de piperitenona foi expresso pela média das % das áreas obtidas.

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

Handwritten signature



FMQ-07
Emissão: GGQ

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

RELATÓRIO TÉCNICO



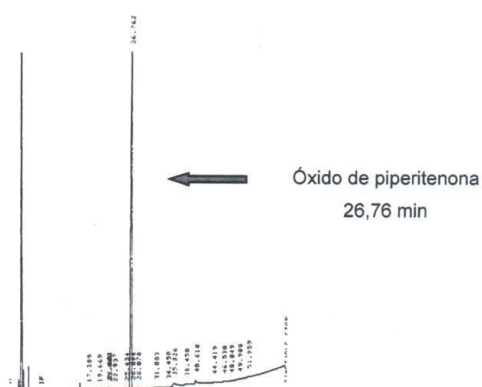
CENTRO PLURIDISCIPLINAR DE PESQUISAS
QUÍMICAS, BIOLÓGICAS E AGRÍCOLAS

Edição/Revisão: 2/4

NÚMERO PROCESSO: CPQBA 444/12 DQOF

PÁGINA: 4 de 2

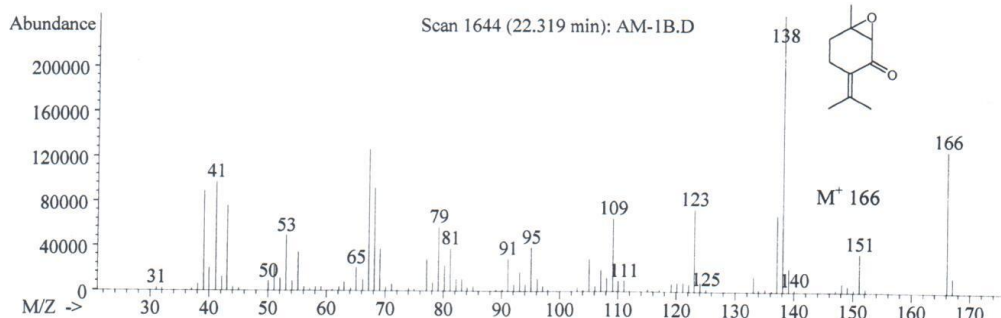
CROMATOGRAMA OBTIDO PARA O ÓXIDO DE PIPERITENONA



RUN# 3 WUG 9, 2012 14:01:38				
SIGNAL FILE: M: SIGNAL.BNC				
WREH:				
RT	WREH	TYPE	WIDTH	WREH1
17.369	12226	PB	.084	.06772
19.669	26670	PB	.179	.14773
21.691	34852	PB	.069	.19385
21.802	3917	BB	.024	.02170
22.937	12894	PB	.071	.07253
25.434	37990	PB	.134	.21043
26.762	17594896	PB	.233	97.46160
26.866	13351	BB	.055	.07395
28.070	27110	PB	.099	.15817
31.003	54824	VB	.071	.30369
38.450	46651	PB	.294	.25941
40.010	155981	PB	.245	.06401
44.419	15161	PB	.106	.06398
46.530	13804	PB	.104	.07691
48.049	2265	PB	.106	.01255
49.908	298	PB	.016	.00165

TOTHL WREH=1.8053E+07
MUL FACTOR=1.0000E+00

ESPECTRO DE MASSAS DO ÓXIDO DE PIPERITENONA



Vera Lúcia Garcia Rehder

Dra. Vera Lúcia Garcia Rehder
CRQ - 04130876 - 4ª região
RESPONSÁVEL PELO ENSAIO

Os resultados e conclusões deste relatório se restringem exclusivamente às condições de ensaio e produtos analisados, sendo vetado sua utilização parcial para qualquer fim. O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do(s) autor(es) e não representam opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem. O nome do CPQBA/UNICAMP não pode ser utilizado para divulgação ou publicidade do produto ou empresa sob qualquer forma.

FONE: (19) 2139 2850

FAX: (19) 2139 2852

e-mail: cenpesq@cpqba.unicamp.br

Revista Brasileira de Toxicologia



ISSN 1415-2983

VOLUME 23 SUPLEMENTO 1, NOVEMBRO 2010

Brazilian Journal of Toxicology
Órgão Oficial da Sociedade Brasileira de Toxicologia

201 INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha crisper* NO PERFIL HEMATOLÓGICO DE RATOS WISTAR

Silva RLC*(1), Franco ES(2), Melo ACO(2), Silva JKC(2), Oliveira AP(2), Brasileiro CF(2), Baltar SLSMA(2), Lobo JMCNS(3), Paulo MQ(4), Maia MBS(2). (1) Doutoranda da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto/ Portugal; (2) Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas /UFPE; (3) Conselho Diretivo Faculdade de Farmácia. (1, 3) - Portugal; (2, 4) – Brasil.

Introdução: A *Mentha crisper* (Lamiaceae) é uma planta aromática conhecida popularmente como hortelã-da-folha-miúda. Na medicina popular, as folhas de plantas do gênero *Mentha* têm diversas indicações (anti-parasitária e antilautulento, etc). Os dados fornecidos pelo hemograma são importantes principalmente quando se pretende analisar o efeito de uma droga. **Objetivo:** Avaliar o efeito do óleo essencial de *M. crisper* sobre o perfil hematológico de ratos Wistar. **Métodos:** A *M. crisper* foi coletado no município de Itacuruba – PE, uma exsicata foi depositada no herbário de farmacognosia da UFPE nº HF 001507HF. O óleo foi extraído das folhas através de hidrodestilação. Para realização do ensaio de toxicidade foram utilizados 30 ratos Wistar (machos e fêmeas, 200-300g) divididos em três grupos (n=10) os quais receberam óleo essencial de *M. crisper* diluído em óleo de milho (OEMC, 50 ou 100µL/kg; veiculado em óleo de milho (0,3mL, v.o.)), durante 35 dias consecutivos. O grupo controle recebeu óleo de milho (0,3mL). No 35º dia foram coletadas amostras de sangue do plexo infraorbital, em tubos contendo anticoagulante (Vacuette), para determinação do perfil hematológico utilizando contador de células sanguíneas automático. Os valores de contagem de plaquetas, hemácias, hemoglobina, hematócrito, concentração de hemoglobina corpuscular média, hemoglobina corpuscular média, volume corpuscular médio e os valores de contagem total e diferencial de leucócitos, foram comparados com o do grupo controle. Protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE nº23076.007695/2009-19. **Resultados:** O OEMC nas doses (50 ou 100µL/kg) não provocou alterações estatisticamente significante (p>0,05) no perfil hematológico. A contagem de eritrócitos foi normal e nenhuma alteração foi observada no hematócrito ou nos valores de hemoglobina. As plaquetas permaneceram inalteradas em número. Provavelmente o produto testado não causa danos diretos nas células sanguíneas, na medula óssea ou na absorção ou incorporação de nutrientes necessários para a eritropoiese, pelo menos, num grau suficiente para causar anemia. Similarmente, não houve efeitos significantes na contagem total ou diferencial das células sanguíneas da linhagem leucocitária. **Conclusão:** O OEMC nas doses de 50 e 100µL/kg não apresentaram efeito de toxicidade a nível hematológico, quando testadas na forma sub-crônico em ratos Wistar.

Palavra Chave: Perfil Hematológico, Óleo Essencial, *Mentha Crisper*, Toxicidade.

187 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO SUB-CRÔNICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha crisper* SOBRE PESO CORPÓREO E ÓRGÃOS VITAIS EM RATOS WISTAR

Silva RLC*(1), Franco ES(2), Melo ACO(2), Silva JKC(2), Oliveira AP(2), Brasileiro CF(2), Baltar SLSMA(2), Lobo JMCNS(3), Paulo MQ(4); Maia MBS(2). (1) Doutoranda da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto/ Portugal; (2) Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas /UFPE; (3) Conselho Diretivo Faculdade de Farmácia. (1, 3) - Portugal; (2, 3) – Brasil

Introdução: O ganho de peso corpóreo e dos órgãos são parâmetros importantes na avaliação de possíveis efeitos tóxicos cumulativo, inerente a determinadas substâncias naturais ou sintéticas. **Objetivos:** Investigar a influência da administração sub-crônica oral do óleo essencial de *Mentha crisper* no peso corpóreo e órgãos vitais em ratos Wistar. **Métodos:** A *M. crisper* foi coletado no município de Itacuruba – PE, uma exsicata foi depositada no herbário de farmacognosia da UFPE nº HF 001507HF. O óleo foi extraído das folhas através de hidrodestilação. Para realização do ensaio de toxicidade foram utilizados 30 ratos Wistar (machos e fêmeas, 200-300g) divididos em três grupos (n=10) os quais receberam óleo essencial de *M. crisper* diluído em óleo de milho (OEMC, 50 ou 100µL/kg; veiculado em óleo de milho (0,3mL, v.o.)), durante 35 dias consecutivos. O grupo controle recebeu óleo de milho (0,3mL). Semanalmente os animais foram avaliados quanto ao ganho de peso e ao final do 35º dia foram eutanasiados em câmara de CO₂, para proceder à avaliação macroscópica e pesagem dos órgãos vitais (coração, pulmão, estômago, fígado, baço, rins, testículos, ovário e útero). Protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE nº23076.007695/2009-19. **Resultados:** A avaliação do desempenho do peso corpóreo demonstrou que não ocorreu diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), quando se comparou os grupos tratados com o OEMC nas doses de 50 ou 100µL/kg com o grupo controle. Quanto ao peso dos órgãos foi observado um aumento (5,71%) estatisticamente significativa ($p>0,05$) da massa cardíaca do grupo tratado com o OEMC 100µL/kg (machos 1,48±0,08g) quando comparado ao grupo controle (machos 1,4±0,10g). O peso dos demais órgãos avaliados dos machos e das fêmeas, nas doses testadas, comparado ao grupo controle não diferiram estatisticamente. **Conclusão:** O óleo essencial de *Mentha crisper* na dose de 100µL/kg foi capaz de aumentar o peso da massa cardíaca dos ratos wistar machos quando comparado com o grupo controle.

Palavra Chave: Peso Corpóreo, Peso órgãos, Toxicidade, Sub-Crônica, Óleo essencial, *Mentha crisper*.

200 INFLUÊNCIA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha crisper* NO PERFIL BIOQUÍMICO DE RATOS WISTAR

Franco ES*(1), Silva RLC(2), Melo ACO(1), Silva JKC(1), Oliveira AP(1), Brasileiro CF(1), Baltar SLSMA(1), Lobo JMCNS(3), Paulo MQ(4), Maia MBS(1). (1) Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas /UFPE; (2) Doutoranda da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto/Portugal; (3) Conselho Diretivo Faculdade de Farmácia. (1, 4) - Brasil; (2, 3) - Portugal.

Introdução: A *Mentha crisper* (Lamiaceae) é uma planta aromática conhecida popularmente como hortelã-de-cheiro, hortelã-da-horta, hortelã-do-brasil e hortelã-da-folha-miúda. Na medicina popular, as folhas de plantas do gênero *Mentha* têm diversas indicações (anti-parasitária e antilautulento, etc). As folhas da *M. crisper* apresentam um óleo essencial, composto principalmente de óxido de piperitenona, Germacreno, Trans beta-ocimeno e Beta-cariofileno. Os efeitos tóxicos dos óleos voláteis podem ser desencadeados após exposição aguda e/ou crônica. **Objetivo:** Avaliar o efeito do óleo essencial de *M. crisper* sobre o perfil bioquímico de ratos Wistar. **Métodos:** A *M. crisper* foi coletado no município de Itacuruba - PE, uma exsiccata foi depositada no herbário de farmacognosia da UFPE nº HF 001507HF. O óleo foi extraído das folhas através de hidrodestilação. Para realização do ensaio de toxicidade foram utilizados 15 ratos Wistar (fêmeas, 200-250g) divididos em três grupos (n=5 animais/grupo) os quais receberam óleo essencial de *M. crisper* diluído em óleo de milho (OEMC, 50 ou 100µL/kg; veiculado em óleo de milho (0,3mL, v.o.)), durante 35 dias consecutivos. O grupo controle recebeu óleo de milho (0,3mL). No 35º dia foram coletadas amostras de sangue do plexo infraorbital, em tubos com gel separador para soro (Vacuette) e centrifugadas a 7000rpm, para determinação do perfil bioquímico (uréia, creatinina, ácido úrico, bilirrubina total, transaminase glutâmica oxalacética (TGO), transaminase glutâmica pirúvica (TGP), fosfatase alcalina (FA), glicose, colesterol HDL e LDL e triglicerídeos). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE nº23076.007695/2009-19. **Resultados:** Nas doses administradas, o OEMC aumentou significativamente (p>0,05) as concentrações séricas de TGP, TGO, FA e LDL. Os níveis de TGO (115,2±9,47U/L) nos animais tratados com OEMC 50µL/kg apresentou-se 18,76% mais elevado que o controle. Os níveis séricos de TGP (75±9,97U/L) e FA (184,4±32,08U/L) elevaram respectivamente, em 25,83% e 60,34% nos animais tratados com OEMC 100µL/kg quando comparados com o controle. As concentrações séricas de LDL nos animais tratados com OEMC 50µL/kg (61±8,60U/L) ou 100µL/kg (70,6±6,88U/L) apresentaram redução de 32,81% e 22,24% quando comparados com controle, respectivamente. **Conclusão:** A administração sub-crônica do OEMC (50µL/kg ou 100µL/kg; v.o.) aumentou os níveis séricos de TGO, TGP e FA e reduziu o LDL em ratos Wistar.

Palavra Chave: *Mentha crisper*, Óleo essencial, Perfil bioquímico, Toxicidade.

191 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Mentha crispa* (HORTELÃ DA FOLHA MIUDA) EM CAMUNDONGOS SWISS

Franco ES*(1), Silva RLC(2), Aquino CMF (1), Oliveira AP(1), Brasileiro CF(1), Baltar SLSMA(1), Lobo JMCNS(3), Paulo MQ(4), Maia MBS(1). (1) Laboratório de Farmacologia de Produtos Bioativos, Departamento de Farmacologia e Fisiologia, Centro de Ciências Biológicas /UFPE; (2) Doutoranda da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto/Portugal; (3) Conselho Diretivo Faculdade de Farmácia. (1, 4) - Brasil; (2, 3) - Portugal

Objetivos: Avaliar a toxicidade pré-clínica e determinar a DL50 do óleo essencial de *Mentha crispa* por gavagem em camundongos Swiss. **Métodos:** A *M. crispa* foi coletado no município de Itacuruba - PE, uma exsiccata foi depositada no herbário de farmacognosia da UFPE nº HF 001507HF. O óleo foi extraído das folhas através de hidrodestilação. Para realização do ensaio de toxicidade aguda foram utilizados 80 camundongos (machos e fêmeas, 25-30g) divididos em oito grupos (n=10) os quais receberam óleo essencial de *M. crispa* diluído em óleo de milho (OEMC, 2,5; 1,5; 1,0; 0,80; 0,75; 0,50 ou 0,25mL/kg; veiculado em óleo de milho (0,2mL, v.o.)), em administração única. O grupo controle recebeu óleo de milho (0,2mL). Os animais foram observados atentamente durante as quatro primeiras horas e a cada 24 horas até o 14º dia. No final os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, em seguida efetuada a análise macroscópica do fígado, pulmão, baço, rins e estômago. Protocolo experimental aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE nº23076.007695/2009-19. **Resultados:** Após a administração o efeito irritante do produto foi observado através do comportamento dos animais de coçar e arrastar o focinho. Dez minutos após a administração 100% dos animais tratados com 2,5; 1,5 ou 1,0mL/kg apresentaram excitação, reação de fuga e sialorréia. Entre 20 e 180 minutos foram observados: dispnéia, perda da coordenação motora do trem posterior com aparecimento de tremores, ptose palpebral, convulsões e ataxia. Após esta fase excitatória, todos os animais dos grupos tratados com OEMC (2,5; 1,5 ou 1,0mL/kg; v.o.) apresentaram palidez nas extremidades, contorção abdominal, arqueamento da coluna, depressão, micção e morte com a musculatura espástica. Na dose de 0,75mL/kg, após três horas, 20% dos animais apresentaram sialorréia e ptose palpebral e 60% apresentaram reação de fuga. Na dose de 0,50mL/kg, após uma hora, 40% dos animais apresentaram ptose palpebral e 20% apresentou reação de fuga. Na dose de 0,25mL/kg um único animal apresentou comportamento de coçar o focinho e reação de fuga. Entretanto não ocorreu mortalidade, nos grupos 0,75; 0,50 e 0,25mL/kg. A dose letal (DL50%) calculada pelo método dos probitos foi de 0,80mL/kg. Na avaliação macroscópica dos órgãos os animais tratados com o OEMC não diferiram do controle. **Conclusão:** O óleo essencial de *Mentha crispa* apresenta um elevado grau de toxicidade em camundongos albinos Swiss, com uma DL50 de 0,80 mL/kg.

Palavra Chave: Toxicidade aguda, Óleo essencial, *Mentha crispa*, DL50.